
ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR LES CYTOTOXINES

PAR M. ÉLIE METCHNIKOFF

Sous le nom de cytotoxines, je propose de désigner ces poisons des éléments figurés, poisons d'origine animale, qui ont dans ces derniers temps attiré l'attention générale des pathologistes. Et cependant leur découverte première est déjà assez ancienne. A l'époque où l'on essayait la transfusion à l'homme du sang ou du sérum de divers mammifères, notamment de mouton, on s'est aperçu du danger de cette intervention, à cause de l'action dissolvante de ces humeurs sur les globules du sang humain. Les praticiens avaient signalé des accidents très graves, souvent mortels, comme la coagulation du sang dans les vaisseaux, la formation des thrombus et des infarctus dans les poumons, l'extravasation sur des séreuses, etc. Les pathologistes, notamment Panum, Ponfick, Hayem, Landois établirent comme cause de ces phénomènes la dissolution des hématies et des leucocytes d'homme par le sang d'espèce étrangère. La pratique de la transfusion du sang animal à l'homme a dû être abandonnée¹, et, avec elle, la découverte des premières cytotoxines, faite il y a plus de vingt-cinq ans, a été presque complètement oubliée.

L'étude de ces poisons ne fut reprise qu'à la suite des recherches sur la propriété microbicide du sérum sanguin de différents animaux. Il y a déjà plus de dix ans² que j'avais signalé l'analogie entre ce pouvoir microbicide des sérums et leur propriété de dissoudre les globules rouges du sang, mais ce sont surtout

1. L'histoire de cette période se trouve résumée dans une brochure de M. Ziemssen, dans *Klinische Vorträge*, 1887.

2. Ces *Annales* 1889, p. 669.

MM. Daremberg¹ et Buchner² qui attirèrent l'attention des savants par leurs recherches sur ce sujet. Ils ont démontré que la destruction des bactéries et des globules rouges par les sérums suit les même lois et s'opère par le même mécanisme. M. Buchner ajouta encore des faits nouveaux sur la destruction des leucocytes par des sérums sanguins d'espèces étrangères.

Les lignes qui précèdent se rapportent exclusivement aux poisons globulaires qui sont naturellement contenus dans les divers sérums. La découverte des cytotoxines artificielles ne fut faite que beaucoup plus tard. Dans une petite publication de MM. Belfanti et Carbone³, qui ne remonte qu'au mois de juillet 1898, il est pour la première fois question d'une substance toxique qui se développe dans les sérums sanguins des animaux, traités avec du sang d'espèce étrangère. Ainsi le sérum d'un cheval, auquel on avait injecté dans le péritoine une forte quantité de sang de lapin, est devenu très toxique pour ce rongeur. Le sérum du chien, traité avec du sang de lapin, acquiert pour cette espèce un pouvoir toxique encore plus prononcé. MM. Belfanti et Carbone ont établi que ces sérums ne deviennent très toxiques que pour les espèces qui avaient fourni le sang à injecter, qu'ils sont très peu toxiques pour des espèces tierces, et pas du tout toxiques pour l'espèce animale qui fournit le sérum. Ces auteurs ne se prononcent pas sur la cause de cette toxicité. Indépendamment des observateurs italiens, M. J. Bordet, de l'Institut Pasteur, a commencé ses études dans l'été de 1898; il a pu facilement constater que le sérum sanguin d'un animal (cobaye), injecté avec du sang d'espèce étrangère (lapin), acquiert la propriété de dissoudre les globules rouges du lapin, et, grâce à ce pouvoir cytotoxique, devient un poison très violent pour ce rongeur.

M. Bordet a établi en outre que l'analogie entre la propriété microbicide et le pouvoir hémolytique du sérum des animaux préparés est très profonde, car dans les deux cas il s'agit de poisons spécifiques, constitués par deux substances qui concourent à la même œuvre. Tandis que le premier des deux

1. *Archives de méd. expér.* 1891, p. 720.

2. *Archiv. f. Hygiene.* T. XVII.

3. Produzione di sostanze tossiche nel siero di animali inoculati con sangue eterogeneo, *Giornale della R. Acad. di med. di Torino*, 1898, n° 8.

poisons (l'alexine) est préformé chez l'animal normal, le second (substance sensibilisatrice) se produit pendant le traitement avec du sang d'espèce étrangère ou bien avec des produits bactériens.

La théorie des deux substances qui se réunissent pour former le poison des hématies et des bactéries est actuellement admise d'une façon générale. Elle l'est aussi en Allemagne, où elle a été d'abord acceptée et développée par MM. Ehrlich et Morgenroth dans leurs trois mémoires très remarquables sur l'hémolyse¹. Le fait fondamental, établi par ces savants, est la fixation énergique de la substance sensibilisatrice, désignée par eux sous le nom de « Zwischenkörper », ou substance intermédiaire, par les hématies. C'est cette substance qui par elle-même est incapable de dissoudre les globules rouges, mais qui, grâce à son affinité avec ces éléments d'un côté et le ferment hémolytique, ou « complément » (alexine), de l'autre, amène la dissolution des hématies. MM. Ehrlich et Morgenroth ont même pu trouver une certaine quantité de ce complément dans le sérum de certains animaux normaux, non préparés par des injections de sang. Dans leur troisième mémoire qui vient de paraître, ces auteurs recherchent s'il est possible d'obtenir une action hémolytique du sérum des animaux, préparés non plus avec du sang d'espèce étrangère, mais avec du sang de la même espèce et du même individu. Ils ont pu constater que des injections répétées de sang de chèvre (sang avarié par son mélange avec de l'eau) à des chèvres, amènent la production d'un sérum hémolytique, capable de dissoudre les hématies des chèvres différentes de celles qui fournissent le sérum. Ils concluent à la possibilité d'obtenir des « Isolysines », c'est-à-dire des toxines qui dissolvent les globules rouges d'autres individus de la même espèce. Par contre, ils n'ont jamais pu préparer une « Autolysine », poison capable de dissoudre les hématies de chèvre, injectée avec du sang de la même ou d'une autre chèvre. A la fin de leurs deux derniers mémoires, MM. Ehrlich et Morgenroth concluent à une très grande complexité des phénomènes de production des hémolysines, ce qui ne leur permet pas d'arriver à une conclusion précise ni définitive sur ce phénomène.

1. *Berliner klinische Wochenschrift*. 1899. Nos 1 et 22; 1900. N° 21.

Il était facile de prévoir que l'hémolysine, produite à la suite d'injections, n'est pas la seule cytotoxine qu'on puisse obtenir artificiellement. Aussi, dans un article sur l'atrophie sénile, rédigé bientôt après le premier mémoire de M. Bordet et publié (en russe) en février 1899¹, nous avons émis cette supposition qu'il doit être possible de préparer des cytotoxines spécifiques contre toute sorte d'éléments figurés, et que ces poisons artificiels pourraient rendre des services pour régulariser les fonctions cellulaires anormales. Cette idée s'imposait pour ainsi dire comme conclusion naturelle de la découverte de l'hémolysine artificielle, de sorte qu'il n'y a rien d'étonnant qu'elle soit venue simultanément à l'esprit de plusieurs chercheurs.

En effet, bientôt après notre publication, M. Landsteiner annonça la découverte de la spermotoxine dans le sérum de lapins soumis à des injections de spermatozoïdes de taureau, et M. de Dungern publia la description d'une toxine artificielle qui immobilise les cils vibratiles de l'épithélium de la trachée de bœuf, toxine obtenue par un procédé analogue.

Actuellement, en dehors de l'hémotoxine (ou hémolysine), on a déjà obtenu la spermotoxine², la trichotoxine³, la leucotoxine⁴ et la néphrotoxine⁵, préparées toujours d'après la même méthode, c'est-à-dire par des injections des cellules correspondantes. On a rencontré plus de difficultés dans la préparation de la névrotoxine, mais les essais, entrepris dans mon laboratoire, ont fini par aboutir à un résultat assez satisfaisant dans cette voie.

Les premières recherches sur les cytotoxines ont fait ressortir le caractère spécifique de ces poisons. L'hémotoxine dissout les globules rouges, mais n'attaque pas les autres cellules de l'organisme. D'un autre côté, le poison préparé avec le sang d'une espèce animale, est actif pour les hématies de cette dernière. Et cependant il y a des exemples assez nombreux, où l'hémotoxine s'est montrée plus ou moins efficace sur les hématies des espèces tierces, mais toujours son activité a été moindre

1. *Archives russes de pathologie*. Février 1899.

2. LANDSTEINER, *Centralb. f. Bacteriol.* 1899.

3. V. DUNGERN, *Münch. med. Woch.* 1899.

4. METCHNIKOFF, *Ces Annales* 1899; DELEZENNE, *C. R. Ac. Sc.* 1900. 2. IV; FUNK, *Centr. f. Bacter.* 1900.

5. LINDEMANN, *Ces Annales* 1900.

que vis-à-vis des globules rouges de l'espèce qui a fourni le sang pour les injections. D'un autre côté, comme ceci résulte des dernières expériences de MM. Ehrlich et Morgenroth, un sérum hémolytique peut n'être actif que pour certains individus d'une espèce, mais non pour tous.

Le regretté Moxter, dans son étude sur la spermotoxine, s'est élevé contre l'idée de la spécificité des cytotoxines. D'après lui, la substance qui tue les spermatozoïdes de mouton est celle qui dissout aussi les hématies de cette espèce. Moxter est arrivé à cette conclusion en constatant que le sérum spermotoxique de lapins, traités, avec l'épididyme des moutons, acquiert un certain pouvoir hémolytique. Il voit une preuve décisive en faveur de son opinion dans la circonstance que les spermatozoïdes, ajoutés au sérum actif, lui enlèvent une partie de son pouvoir hémolytique. Une cytotoxine artificielle agirait donc contre deux éléments figurés de nature aussi diverse que les spermatozoïdes et les hématies.

Comme il est très important de se faire une idée exacte sur le caractère spécifique des cytotoxines, et comme l'opinion de M. Moxter se trouve en parfait désaccord avec l'ensemble des faits acquis sur les cytotoxines, j'ai voulu étudier cette question à l'aide d'expériences personnelles. Malgré toutes les précautions, il est impossible de recueillir du contenu des épididymes des moutons sans aucun mélange de sang. On injecte donc inévitablement avec le sperme une certaine quantité d'hématies, qui peuvent et doivent même provoquer la production de l'hémolysine. Par contre, il est très facile d'éviter les spermatozoïdes, en n'injectant que du sang défibriné de mouton à des lapins. Si l'hémolysine est le même poison qui tue les spermatozoïdes, comme le pense M. Moxter, le sérum de lapins, préparé avec du sang de mouton, devra acquérir une toxicité vis-à-vis des éléments mâles.

L'expérience, plusieurs fois répétée, a démontré l'inexactitude de cette supposition. Le sérum hémolytique de lapin, qui dissout les hématies de mouton en peu de temps, n'immobilise pas les spermatozoïdes de ce ruminant, plus vite que le sérum de lapins neufs, dépourvu de toute action hémolytique. Bien plus, dans les trois expériences que j'avais faites, les spermatozoïdes de mouton ont gardé plus longtemps leur mobilité dans

le sérum hémolytique des lapins, préparés par des injections de sang de mouton, que dans le sérum de lapin neuf. Il se produit donc chez ce rongeur une hémolysine, tout à fait distincte de la spermotoxine, contrairement à l'opinion de Moxter. La spécificité des cytotoxines dans leur action vis-à-vis des catégories particulières d'éléments figurés est donc un fait général qui ne doit plus être méconnu.

Dans un travail sur la résorption des cellules¹, j'ai exprimé l'opinion que les deux parties constituantes des cytotoxines sont liées aux phagocytes, et représentent les ferments de la digestion intracellulaire. Mais, tandis que les alexines sont contenues dans l'intérieur de ces cellules et ne s'en échappent que dans des cas particuliers, lorsqu'il se produit une avarie des phagocytes, ou « phagolyse », la substance intermédiaire (ou sensibilisatrice) peut-être excrétée par les phagocytes et se retrouver dans les plasmas du sang et des exsudats. D'après cette théorie, l'action cytotoxique ne se produit dans l'organisme que lorsque les deux ferments se rencontrent. Ceci arrive à l'état normal, dans l'intérieur des phagocytes; au contraire, à l'état de phagolyse, cette rencontre peut avoir lieu en dehors des cellules, notamment dans le plasma du liquide péritonéal. Lorsqu'on empêche la phagolyse par la préparation des phagocytes, la substance intermédiaire peut se fixer sur les éléments sensibles dans les plasmas, mais la dissolution définitive ne se produit que dans le contenu des phagocytes.

Cette théorie a été basée sur toute une série de données bien établies, parmi lesquelles il faut donner la première place au fait que les hématies et d'autres éléments figurés d'espèce étrangère sont dissous, dans le péritoine des animaux neufs, uniquement dans l'intérieur des phagocytes. Ce fait s'est trouvé en contradiction avec une assertion de M. de Dungern qui, dans son premier mémoire sur l'hémolyse², insista sur l'absence de toute phagocytose dans le péritoine de cobayes, auxquels il avait injecté du sang de pigeon et de poule. Mais cette affirmation étant basée sur des observations erronées, j'ai dû en relever l'inexactitude dans mon mémoire sur la résorption des cel-

1. Ces *Annales*, 1899.

2. *Münchener medic. Wochenschr.* 1899, nos 43 et 44.

lules. Dans sa dernière publication, M. de Dungern¹ revient sur cette question. Il reconnaît à présent que l'englobement des hématies par des phagocytes se produit réellement, mais seulement dans le cas où l'on se sert « de globules rouges plus résistants, que l'on injecte en plus fortes doses ». Lorsqu'au contraire on emploie des hématies peu résistantes (sang de poule) et en petites doses, elles dégènèrent et se dissolvent dans leur plus grande partie, avant d'être englobées par les macrophages d'une façon tant soit peu notable. Je ne peux nullement partager l'opinion éclectique de M. de Dungern, et ceci parce que le fait, invoqué par lui, est contredit par l'observation. Lorsqu'on injecte dans le péritoine de cobayes neufs de très petites doses de sang défibriné de poule (par ex. 1/8 c.c.), on constate, avec facilité et précision, que les hématies sont bientôt accolées à la surface des macrophages et transportées dans leur intérieur. Il ne se produit pas la moindre dissolution des hématies nucléées dans le liquide de l'exsudat. La seule différence avec le cas où l'on injecte des quantités plus grandes de sang consiste en ceci, que la phagocytose des petites doses s'accomplit beaucoup plus vite, dans un espace de 3 à 4 heures. Je maintiens donc mon affirmation sur la phagocytose des hématies d'oiseaux dans le péritoine de cobayes neufs.

Je suis obligé de contredire encore M. de Dungern, lorsqu'il m'attribue l'assertion que, dans le tissu sous-cutané du cobaye, la dissolution des hématies d'oie se fait presque exclusivement en dehors des cellules. Je n'ai jamais dit cela, comme on peut s'en convaincre en parcourant les pages 755 et 756 de mon mémoire sur la résorption. Je ne l'ai jamais dit, par la raison que, dans le tissu sous-cutané, une partie des hématies seulement est dissoute dans le liquide, tandis que l'autre partie est digérée par les phagocytes qui se réunissent au point d'injection.

En maintenant les arguments que je faisais valoir en faveur de l'origine phagocytaire des cytotoxines, je pourrais en ajouter d'autres. D'après cette théorie, l'absence de l'hémolysine dans le sérum d'animaux, injectés avec du sang de même espèce, s'expliquerait par l'absence de phagocytose dans ces conditions et par la résorption directe des hématies dans la circulation, sans dissolution préalable. MM. Ehrlich et Morgenroth viennent

1. *Münchener medic. Wochenschr.* 1900, n° 20.

de démontrer la possibilité d'obtenir une isolysine à la suite d'injections du sang de même espèce. Seulement, pour arriver à ce résultat, au lieu d'injecter le sang intact, ils introduisaient dans le péritoine de leurs chèvres du sang de cette espèce, préalablement traité avec de l'eau. Les hématies étaient détruites dans ces conditions et subissaient une dissolution partielle. Il est évident que, dans cet état, elles ne pouvaient plus passer directement dans la circulation, mais devaient être inévitablement saisies et digérées par les phagocytes. Il y avait donc encore un exemple où la production d'hémolysine coïnciderait avec la phagocytose.

Mais ce mémoire n'est pas destiné à aborder le côté théorique de l'étude des cytotoxines. Son but est de servir plutôt d'introduction aux trois mémoires qui vont suivre, et qui touchent à l'application pratique des poisons cellulaires.

Après la découverte des cytotoxines artificielles, on devait se demander s'il n'y avait pas lieu de s'en servir pour régulariser certaines fonctions cellulaires dans les maladies ou dans la décrépitude sénile. Ainsi, j'ai exprimé cette hypothèse qu'un sérum qui générerait les macrophages dans leur action contre les éléments nobles, pourrait être utilisé pour conserver ces derniers. C'est dans ce but que je me suis mis à préparer un sérum antiphagocytaire. Mais les faits me montrèrent bientôt l'impossibilité d'arriver au but proposé, et ceci à cause de la destruction des microphages par des sérums préparés exclusivement avec des macrophages. Il a fallu chercher ailleurs la solution du problème. C'est alors que je me suis demandé si de faibles doses des cytotoxines n'étaient point capables de produire une action stimulante sur les éléments figurés correspondants. On savait depuis longtemps que de petites quantités de certains poisons provoquent l'excitation des organes sur lesquels les doses plus fortes agissent d'une façon paralysante. On a réuni beaucoup de faits¹ sur l'accélération des fermentations par des petites doses de poisons, comme les alcaloïdes et les antiseptiques. C'est surtout M. Schultz qui a établi ce fait que beaucoup de poisons de la levure, comme le sublimé, l'iode, l'acide arsé-

1. Ces faits sont résumés dans le 3^e volume de la *Microbiologie* de M. Duclaux.

nieux, etc., appliqués en faible quantité, accélèrent notablement la fermentation alcoolique. Plus tard, M. Effront a tiré de ces données une application pratique pour augmenter le rendement de l'alcool. Il soumet la levure à l'action de doses croissantes d'acide fluorhydrique, et arrive à stimuler cette plante dans son pouvoir fermentescible. Ces exemples, auxquels on pourrait joindre un assez grand nombre d'autres, nous engagèrent à entreprendre une étude systématique sur l'action des petites doses des cytotoxines. Les préparateurs de mon service, MM. les D^{rs} Cantacuzène et Besredka, ont bien voulu se charger d'exécuter des expériences sur l'hémotoxine et la leucotoxine. M. Besredka s'est en outre associé à moi pour faire les premiers essais sur l'homme. Les trois mémoires qui suivent donneront l'exposé des résultats obtenus jusqu'à présent.

Sur les variations quantitatives et qualitatives DES GLOBULES ROUGES

Provoquées chez le lapin par les injections de sérum hémolytique.

PAR LE D^r J. CANTACUZÈNE

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Nous savons, depuis les travaux de J. Bordet, qu'il est possible, en injectant le sang d'une espèce B à une espèce A, de faire apparaître dans le sérum de cette dernière des anticorps spécifiquement hémolytiques pour les globules rouges de l'espèce B.

MM. S. Belfanti et T. Carbone, en 1878, arrivèrent de leur côté au même résultat ; ils constatèrent, d'autre part, que le sérum hémolytique fourni par A est toxique pour B, et détermine sa mort lorsqu'on lui en injecte une quantité suffisante dans les veines ou sous la peau.

Reprenant la question à un autre point de vue, nous nous proposons d'étudier ici les variations survenues dans la teneur du sang en hémoglobine et en globules rouges à la suite des injections, *in vivo*, de sérum hémolytique.

Nos expériences ont porté sur le lapin ; nous avons employé un sérum hémolytique pour les globules rouges de cet animal, et obtenu en injectant à des cobayes des doses croissantes de sang défibriné de lapin.

La technique pour la préparation de ce sérum est des plus simples. On commence par injecter dans le péritoine d'un cobaye 2 c. c. de sang de lapin recueilli aseptiquement et défibriné. La propriété hémolytique du sérum apparaît au bout de 7 jours environ, et va en augmentant les jours suivants ; 12 jours après la première injection, on injecte de nouveau 5 c. c. de sang dans le péritoine ; on fait une troisième injection de 10 c. c. 12 jours plus tard, et une dernière de 15 c. c. au bout du même laps de

temps. On obtient de la sorte un sérum très hémolytique, et dont le pouvoir hémolysant varie de 1 : 2 à 1 : 3. Le même sérum est agglutinant à 1 : 50.

Le sang d'un lapin adulte et en bonne santé contient en moyenne 6,000,000 d'hématies par mill. c. Ce nombre peut varier d'un jour à l'autre, chez le même individu, de 200,000 à 300,000 globules rouges, en plus ou en moins. En outre, le sang contient normalement un certain nombre de petits éléments arrondis, pâles, de 2-3 μ de diamètre, colorables très faiblement par l'éosine, plus faiblement encore par les couleurs basiques d'aniline, et désignés par Hayem sous le nom d'hématoblastes.

Nous leur conserverons cette dénomination sans préjuger en rien de leurs fonctions ni de leur origine. Ces hématoblastes tendent à s'agglutiner en petits amas au sein desquels disparaît leur forme primitive. Le chiffre moyen de ces éléments varie de 200,000 à 250,000 par millimètre cube. Ils sont donc environ 2½ fois moins nombreux que les globules rouges adultes. Entre les hématoblastes et les hématies il existe des formes de passage ou microcytes (5 μ), qui fixent les couleurs acides d'aniline.

On ne trouve que très rarement, dans le sang du lapin normal, des globules rouges à noyau; ces éléments sont un peu plus petits qu'une hématie ordinaire; leur stroma se colore en rose vif par l'éosine; ils contiennent un petit noyau, souvent placé excentriquement, et se colorant avec intensité par les couleurs basiques. Nous avons plusieurs fois observé ces éléments en grand nombre chez des cobayes, dans les cas d'intoxications graves aboutissant à la cachexie, comme par exemple dans l'intoxication cholérique chronique. Ils semblent donc être, chez l'animal adulte, l'expression d'un état pathologique.

Le nombre des leucocytes varie en moyenne de 6,000 à 6,500 par mill. c. On y compte ordinairement 60 polynucléaires, pour 10 mononucléaires et 30 lymphocytes, grands et petits. Les polynucléaires contiennent parfois des granulations pseudo-éosinophiles, mais moins fréquemment que chez le cobaye.

Le titre moyen de l'hémoglobine est de 90 0/0, 100 étant pris pour valeur moyenne du sang humain.

Les variations journalières de l'hémoglobine sont faibles, de quatre à cinq centièmes en dessus ou en dessous, sans régularité appréciable.

MODIFICATIONS OBSERVÉES DANS LE SANG A LA SUITE DES INJECTIONS DE
SÉRUM

a) *Injection de sérum normal.* — Le sérum de cobaye normal n'est pas, *in vitro*, hémolytique pour le sang de lapin. Dans la proportion de 15:1, il détermine une légère agglutination. Cependant son injection au lapin n'est pas absolument indifférente.

Si, en effet, l'on injecte 5 c. c. de sérum de cobaye normal dans la veine auriculaire d'un lapin, il y a dès le lendemain une baisse sensible dans le nombre des hématies, qui tombent par exemple de 5,800,000 à 4,700,000. Puis leur nombre augmente régulièrement pour revenir à la normale au bout de 4-5 jours. Dès le début du processus on constate l'apparition, dans le sang, d'un nombre d'hématoblastes très supérieur à la normale (5000.00 au lieu de 250,000; cette poussée hématoblastique s'éteint au bout de 2-3 jours. Le titre hémoglobine descend, en même temps que le chiffre des hématies s'abaisse : il tombe de 91 à 75, et reste à ce niveau inférieur pendant quelques jours, malgré la hausse globulaire. C'est seulement vers le sixième jour de cette courte maladie qu'il revient à son niveau primitif.

Il y a une légère augmentation du nombre des leucocytes, portant surtout sur les polynucléaires. Les granulations éosinophiles n'augmentent pas. A aucun moment, la santé de l'animal ne semble troublée.

b) *Injection de sérum hémolytique : doses fortes.* — Nous appelons *doses fortes* celles dont l'injection sous-cutanée provoque, à coup sûr, un abaissement simultané dans le chiffre des hématies et dans le titre de l'hémoglobine. Elles sont comprises, pour notre sérum hémolytique, entre ∞ et 1 c. c., la limite inférieure de 1 c. c. étant forcément un peu arbitraire.

Si l'on injecte dans la veine de l'oreille d'un lapin une dose très forte de sérum hémolytique, 15 c. c. par exemple, l'animal, au bout de quelques secondes, tombe, présente des mouvements cloniques violents, des phénomènes de dyspnée et de cyanose aiguës, pousse quelques cris et meurt au bout de 1-2 minutes. Le fait avait déjà été signalé par Belfanti et Carbone.

Si l'on injecte dans la veine une dose non mortelle de sérum hémolytique, 2-3 c. c. par exemple, on observe les phénomènes

suivants : il se produit une diminution presque immédiate du nombre des hématies ; au bout de 1 heure ce nombre a baissé déjà de 1,500,000. Si à ce moment on examine le sang au microscope, on constate que de très nombreux globules rouges sont entourés d'une auréole diffuse se colorant en rose par l'éosine, tandis que le globule placé au centre ne prend plus que faiblement la couleur. Le stroma de l'hématie laisse de la sorte échapper son contenu sous forme de grosses gouttelettes qui apparaissent sur le bord du disque globulaire, puis diffusent dans le milieu ambiant. L'hématie finit par persister sous la forme d'une vésicule vide, incolore, à peine perceptible. Bon nombre d'hématies semblent rester normales.

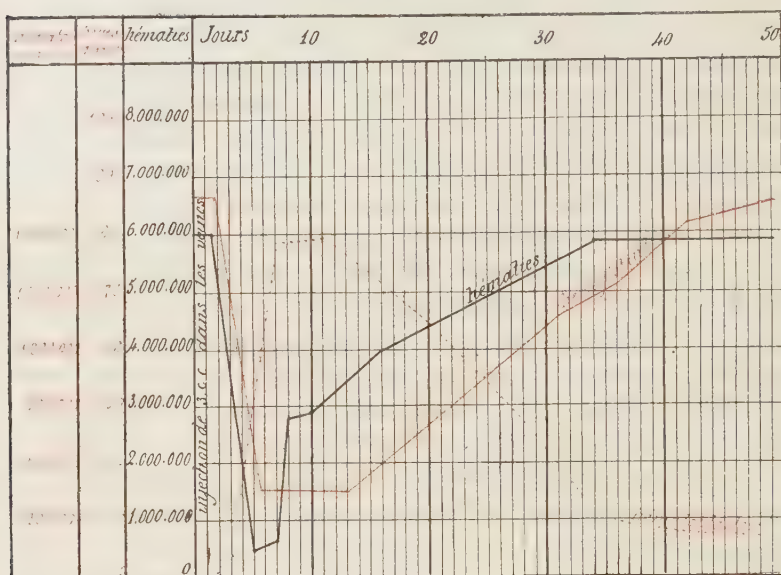
Cette dissolution des hématies dans le sang continue les jours suivants ; au bout de 36 heures leur nombre a passé de 6,000,000 à 600,000 pour tomber à 300,000 au bout de 48 heures. Les 19/20 des globules sont, de la sorte, détruits. A ce moment on trouve encore quelques hématies entourées d'une faible auréole de diffusion. La plupart des éléments restants se colorent avec intensité et présentent l'aspect normal.

A mesure que les phénomènes d'anémie s'accroissent, le nombre des hématies nucléées augmente ; elles atteignent leur maximum lorsque le chiffre des globules rouges est au plus bas.

Vers le quatrième jour, le sang est envahi brusquement par un nombre colossal d'hématoblastes. Leur chiffre, primitivement de 250,000, monte rapidement à 1,700,000 ; en même temps apparaissent une foule de formes de passage entre les hématoblastes et les globules adultes. Le sang présente à ce moment un aspect réellement curieux, à cause de la diversité des hématies, tant au point de vue de la taille qu'au point de vue de l'affinité pour l'éosine. Cette affinité ne se rapproche de celle des globules adultes qu'à partir du moment où les disques atteignent un diamètre de 5-6 μ . Au moment où se fait la poussée hémoblastique, le nombre des globules nucléés commence à baisser rapidement.

C'est également à partir de ce moment que les hématies adultes augmentent en nombre. Leur chiffre est déjà de 2,500,000 une semaine après l'injection ; d'autre part, la poussée des hématoblastes se modère progressivement ; quant aux

globules nucléés, ils ont totalement disparu. Au bout de six semaines environ, le processus de réparation est terminé; le sang a repris sensiblement ses caractères normaux. Cependant le nombre des globules rouges tend plutôt à s'arrêter en deçà du chiffre normal, et, dans tous les cas, ne le dépasse pas.



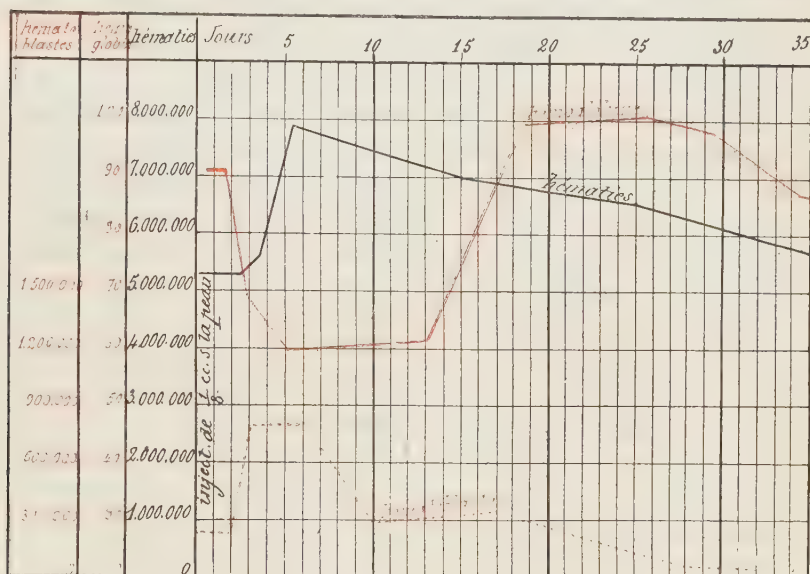
Tracé n° 1.

En même temps que s'opère la déglobulisation, il se produit une chute brusque dans le titre de l'hémoglobine, qui en 4 jours passe de 85 0/0 à 35 0/0. L'hémoglobine se maintient à ce niveau inférieur pendant un temps assez long et ne suit pas immédiatement le mouvement d'ascension des globules rouges. Ce n'est qu'à partir du moment où ces derniers atteignent 2.000.000 au moins par mill. c. que l'hémoglobine augmente progressivement. On peut en conclure que les hémotoblastes ne contiennent pas d'hémoglobine. — Au bout de 7 semaines environ, l'hémoglobine est revenue au taux normal.

Dès le début de ces processus d'anémie, il y a leucocytose marquée dans le sang; le chiffre des leucocytes s'élève de 6,300 à 9,000 par millimètre cube; en outre la proportion des polynucléaires augmente considérablement; elle atteint son

maximum vers le moment où les hématies sont à leur minimum; ces éléments représentent à ce moment 80 0/0 (au lieu de 55 0/0) du nombre total des leucocytes. Ils se maintiennent à ce taux élevé pendant une quinzaine de jours environ, puis diminuent lentement.

Jamais, au cours de ces anémies expérimentales aiguës, nous n'avons vu augmenter le nombre des pseudo-éosinophiles



Tracé n° 2.

dans le sang. Les polynucléaires contiennent, même à ce moment, remarquablement peu de ces granulations (Tracé 1.)

Si l'injection est faite, non pas dans les veines, mais sous la peau, on observe la même série de phénomènes, mais avec une intensité moindre. Toujours on constate que l'augmentation du nombre des globules nucléés accompagne la baisse du chiffre des hématies; puis ils disparaissent quand se fait la poussée hémotblastique.

Si au moment où la richesse globulaire du sang tend à se rapprocher de la normale, on injecte à l'animal une faible dose de sérum hémolytique sous la peau (1/25 c. c. par exemple), on voit se produire une brusque augmentation du chiffre des hématies; sitôt que ce chiffre se met à dépasser le taux normal, presque tous les leucocytes polynucléaires se chargent de grosses

granulations pseudo-éosinophiles. C'est là un fait constamment observé, et qui, nous le verrons plus loin, a une importance réelle au point de vue pronostic.

c) *Injectons de sérum hémolytique : doses faibles.* — Nous appelons *doses faibles* celles dont l'injection sous-cutanée provoque une élévation simultanée dans le chiffre des hématies et dans le titre de l'hémoglobine. Elles sont comprises pour notre sérum hémolytique entre 1/10 c. c. et 1/30 c. c. Au-dessous de cette fraction, l'effet de l'injection sur les variations sanguines n'est plus appréciable.

Entre le groupe des doses fortes et celui des doses faibles, il existe une zone moyenne de doses comprises entre 1 c. c. et 1/10 de c. c., ou *doses demi-faibles*. Les effets de ces dernières sont intéressants à étudier; leur injection sous la peau est marquée en effet, au début, par une dissociation entre les variations de l'hémoglobine d'une part et des hématies de l'autre.

Injectons en effet sous la peau d'un lapin 1/8 c. c. de sérum hémolytique. La richesse globulaire varie peu pendant 48 heures. Puis vers le 3^e jour il y a une élévation notable du chiffre des globules rouges, élévation qui atteint son maximum vers le 5^e jour; le taux globulaire reste élevé pendant une dizaine de jours environ, puis redescend progressivement à la normale. La poussée hématoblastique se fait dès le lendemain de l'injection; à aucun moment on n'observe de globules nucléés.

Le titre de l'hémoglobine baisse au contraire fortement 24 heures après l'injection, pour atteindre un minimum vers le 5^e jour; c'est vers le 11^e jour seulement qu'il s'élève pour dépasser bientôt la normale et se maintenir pendant plusieurs jours à un taux relativement élevé. L'augmentation de l'hémoglobine coïncide, de la sorte, avec la fin de la poussée hématoblastique. (Tracé 2.)

Dès le lendemain de l'injection, presque tous les polynucléaires se chargent de granulations pseudo-éosinophiles.

L'injection des doses faibles, lorsque l'animal est bien portant, s'accompagne constamment d'une augmentation simultanée de la richesse globulaire et du titre hémoglobique.

Par contre, lorsque l'animal est atteint de grippe épidémique des lapins, cette maladie toujours mortelle et si fréquente dans les laboratoires, les injections sont fréquemment suivies d'un

abaissement dans les quantités de globules rouges et d'hémoglobine.

Étudions donc les modifications du sang qui accompagnent l'injection à un lapin sain d'une faible dose ($1/25$ c. c. par exemple) de sérum hémolytique.

Dès le lendemain, on constate une augmentation notable du nombre des hématies ; au bout de 3 jours leur chiffre a passé par exemple de 5,400,000 à 8,800,000. Pendant une semaine le chiffre oscille entre 8 et 9 millions, et redescend à la normale progressivement en 3 semaines. A aucun moment, on ne constate dans le sang la présence de globules nucléés. Par contre, dès le début du processus, le nombre des hémotoblastes augmente considérablement.

Quant à l'hémoglobine, ses variations suivent celles des hématies ; elle passe en 3 jours de 86 par exemple à 105. Elle se maintient quelques jours à ce taux élevé, puis elle diminue tout en restant pendant 2 à 3 semaines au-dessus de la normale.

D'une façon absolument constante, au moment où se fait la poussée hémotoblastique, les polynucléaires se chargent de granulations pseudo-éosinophiles. Le fait est tellement constant qu'il peut servir d'élément de pronostic, l'apparition en grand nombre des granulations pseudo-éosinophiles présageant un accroissement du taux globulaire. Elle manque lorsque ce taux s'abaisse.

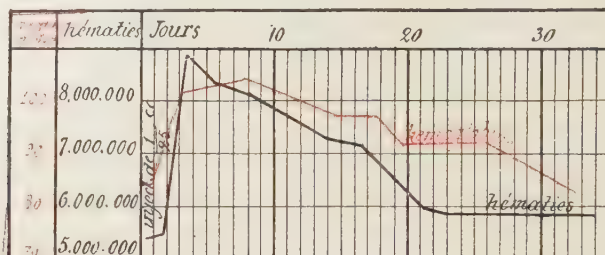
Constamment aussi, l'on observe l'augmentation notable des polynucléaires, qui passent de 58 0/0 à 77 0/0 et cela d'une façon assez durable.

Bref l'injection de faibles doses de sérum s'accompagne d'une élévation rapide des taux globulaire et hémoglobique. Cette élévation persiste de 2 à 3 semaines (Tracés 3 et 4).

d) *Injections répétées de sérum hémolytique à faibles doses.* — Comment varient la richesse globulaire et le titre de l'hémoglobine lorsque l'on réitère les injections en augmentant progressivement les doses de sérum, en un mot lorsque l'on vaccine l'animal contre le sérum hémolytique ?

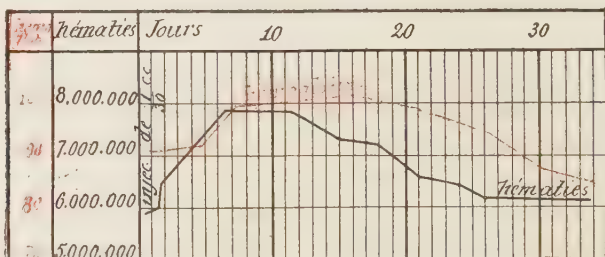
Les intervalles qui séparent deux injections successives doivent être déterminés par l'état de la poussée hémotoblastique. Si en effet la 2^e injection est faite alors que les hémato-

blastés sont encore très nombreux dans le sang, cette injection est fréquemment suivie d'un abaissement dans le nombre des



Tracé n° 3.

hématies et dans le titre de l'hémoglobine; si au contraire on n'injecte une dose nouvelle que lorsque les hémato blastés ont repris leur état d'équilibre, on assiste à une nouvelle augmen-



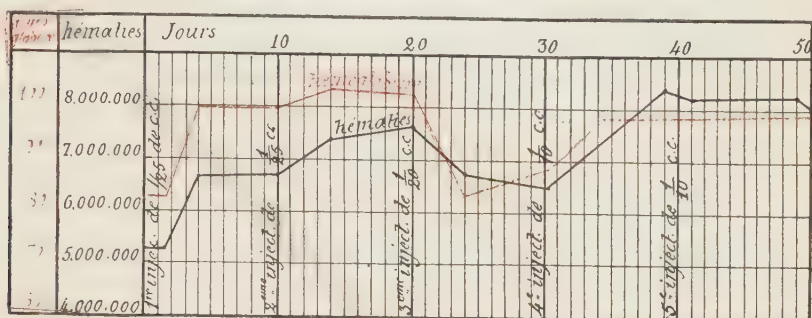
Tracé n° 4.

tation des globules et de l'hémoglobine; cette augmentation est d'ailleurs moins considérable que la première; souvent même elle ne se produit pas après la 2^e injection; il faut renouveler les injections 3 et 4 fois pour la voir apparaître. Chaque accroissement de la richesse sanguine s'accompagne d'une nouvelle poussée d'hématoblastes.

On arrive de la sorte à produire chez l'animal un certain degré d'accoutumance. Au bout d'un petit nombre d'injections suffisamment espacées, on atteint, tant au point de vue de la richesse globulaire qu'au point de vue du titre de l'hémoglobine, un nouveau maximum que l'on ne réussit pas à dépasser, mais auquel on parvient à maintenir le sang pendant quelque temps (6 semaines, dans deux de nos observations). Après quoi les

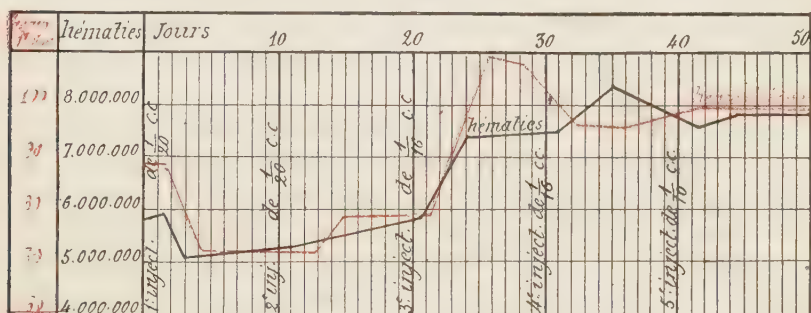
titres globulaire et hémoglobique redescendent progressivement à la normale (Tracés 5 et 6).

Il existe des individus qui ne réagissent pas, dès la 1^{re} injection, dans le sens d'une augmentation globulaire, on trouve



Tracé n° 5.

même des cas (tracé n° 6) où cette 1^{re} injection, quoique faible, est suivie d'une diminution des globules et de l'hémoglobine; cette baisse s'accompagne de l'apparition des globules nucléés. Ce n'est alors qu'après la 2^e ou 3^e injection que se fait la poussée



Tracé n° 6.

hématoblastique, coïncidant, comme toujours, avec la disparition des globules à noyau et l'apparition des granulations pseudo-éosinophiles.

Tels sont les premiers résultats de nos recherches sur l'action, *in vivo*, des sérums hémolytiques. Il importe surtout d'en retenir ceci : c'est que le sérum, hémolytique *in vitro* et *in vivo* pour le sang de lapin, constitue au contraire un stimulant spécifique de

la fonction hématopoiétique lorsqu'il est employé à doses suffisamment faibles.

Plus nous avançons dans l'étude des actions toxiques, plus nous apercevons que la toxicité est une notion toute relative, et que bien des substances qui semblent au premier abord incompatibles avec la vie des cellules, représentent au contraire, à faibles doses, des stimulants biologiques de premier ordre. — L'action excitante du sérum hémolytique n'est qu'un cas particulier de cette loi qui semble appelée à devenir générale.

Voici maintenant, en résumé, les notions qui se dégagent des expériences exposées plus haut :

1° Au-dessus d'une certaine dose, l'injection de sérum hémolytique détermine, *lorsqu'elle n'est pas mortelle*, une déglobulisation aiguë suivie d'une réparation lente du sang, sans que, finalement, la richesse globulaire ou le titre hémoglobique dépasse leur état normal d'équilibre ;

2° Si l'on étudie l'action de doses de plus en plus faibles, on constate qu'il existe, pour chaque individu, une dose minima au-dessous de laquelle l'hémolysine injectée devient stimulante de l'hématopoièse. Dans ce cas, en effet, l'injection de sérum s'accompagne d'une élévation de la richesse globulaire et du titre hémoglobique du sang. Cette élévation persiste quelques jours pour revenir à la normale ;

3° Les injections faibles, répétées et suffisamment espacées, portent à son maximum l'action stimulante du sérum, sans qu'il semble, néanmoins, possible de dépasser une certaine limite marquée, chez le lapin, par le chiffre de 9,000,000 pour les hématies, de 110 pour l'hémoglobine. Le sang se maintient quelques semaines à ce niveau supérieur, puis reprend progressivement à son état d'équilibre primitif. L'élévation du titre hémoglobique persiste sensiblement plus longtemps que l'augmentation de la richesse globulaire ;

4° L'augmentation des globules a débuté dans tous les cas observés par une brusque poussée hémotoblastique, qui s'éteint à mesure que la nouvelle formation globulaire tend vers son maximum. L'apparition dans le sang d'hématies nucléées coïncide avec les périodes de déglobulisation, et cesse sitôt que se fait la poussée d'hématoblastes ;

5° Toute élévation du taux globulaire au-dessus de la nor-

male s'accompagne de l'apparition, dans le protoplasma des leucocytes polynucléaires, de granulations pseudo-éosinophiles, ce qui fournit un bon élément de pronostic relativement à l'énergie de l'hématopoïèse;

6° Les injections de sérum hémolytique déterminent dans le sang une leucocytose et, particulièrement, une polynucléose assez persistante. Le fait s'explique en partie si l'on songe que le sérum hémolytique doit être aussi leucolytique dans une faible mesure.

LA LEUCOTOXINE ET SON ACTION

SUR LE SYSTÈME LEUCOCYTAIRE

PAR LE D^r BESREDKA

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

La conception phagocytaire de M. Metchnikoff sur le mécanisme des phénomènes atrophiques l'a conduit naturellement à rechercher les moyens de paralyser l'activité intempestive des leucocytes, lorsque ceux-ci viennent s'attaquer à des éléments nobles de l'organisme et compromettent ainsi les fonctions essentielles de la vie.

De là est né le sérum antileucocytaire, ou mieux le *sérum leucotoxique*, qui était primitivement destiné, dans l'esprit de son auteur, M. Metchnikoff, à agir exclusivement sur les macrophages, agents si redoutables au cours des processus atrophiques.

Mais lorsque les premières expériences tentées dans cette voie eurent démontré que les sérums leucotoxiques, quel que fût leur mode de préparation, détruisent indifféremment toutes les espèces de leucocytes, mononucléaires aussi bien que polynucléaires, M. Metchnikoff eut l'heureuse idée de tourner la difficulté en se disant que, dans une lutte inégale, on peut intervenir utilement non seulement en affaiblissant celui qui attaque, mais encore en renforçant celui qui est attaqué.

Or, les sérums cyto-toxiques, qui détruisent à haute dose leurs éléments respectifs, devaient *a priori*, par analogie avec ce que l'on sait au sujet de certains poisons et antiseptiques, se montrer stimulants pour ces mêmes éléments, étant employés à faible dose.

Si cette hypothèse venait réellement à se justifier pour les sérums cellulo-toxiques en général, ne serait-ce pas le meilleur moyen de tourner la difficulté dont il vient d'être question, sans

parler du précieux avantage de pouvoir commander en quelque sorte des catégories entières de cellules qui échappaient jusqu'ici presque entièrement à l'influence extérieure.

Il ne restait donc qu'à rechercher expérimentalement jusqu'à quel point l'analogie indiquée est vraie, en d'autres termes, si véritablement les sérums destructeurs de cellules sont capables, injectés à faible dose, de provoquer un effet tout opposé à celui qu'ils produisent à haute dose.

Le présent travail ne constitue qu'une page de ce nouveau chapitre de microbiologie dû à M. Metchnikoff; il a pour but de montrer que l'effet stimulant de petites doses n'est pas une vue de l'esprit, mais repose sur des faits faciles à mettre en évidence, notamment en ce qui concerne le sérum leucotoxique.

Les sérums leucotoxiques sont spécifiques dans la majorité des cas : un sérum qui détruit les leucocytes d'un animal n'est généralement pas actif vis-à-vis des leucocytes d'un animal d'une autre espèce.

Dans l'espoir d'obtenir un sérum contre les globules blancs de l'homme, nous avons essayé toute une série de sérums préparés avec les ganglions lymphatiques provenant d'un certain nombre d'animaux (cheval, bœuf, veau, mouton, chèvre, chien); aucun de ces sérums ne se montra actif à l'égard des leucocytes humains.

Cette spécificité n'est pas cependant absolue; ainsi, dans une de nos expériences, un sérum leucotoxique pour le bœuf, fourni par un cobaye, l'a été aussi pour le lapin; de même, un sérum de chèvre, leucolytique pour l'homme, se montra fortement leucotoxique pour les globules blancs de cobayes¹; mais ce sont là plutôt des exceptions qui n'infirment pas le principe de spécificité couramment observé.

Comme nous nous proposons d'opérer seulement sur des lapins et des cobayes, c'est aux ganglions mésentériques de ces deux rongeurs que nous nous sommes adressé pour la préparation de leurs leucotoxines respectives.

Pour avoir une bonne leucotoxine, active pour le lapin, il suffit d'injecter sous la peau du cobaye une émulsion d'une

1. Ce sérum se montra également très actif vis-à-vis des leucocytes de lapin, mais cette propriété existait déjà avant l'immunisation à un très fort degré.

moitié de pancréas Aselli de lapin, et cela à deux reprises, à huit jours d'intervalle. Quinze jours après la première injection, on obtient dans ces conditions un sérum qui dissout les globules blancs de lapin en proportion de 1/20 en moyenne (une partie de sérum pour 20 parties de lymphé péritonéale).

La leucotoxine est moins forte lorsqu'on s'adresse au lapin comme fournisseur de sérum, et qu'on lui injecte des ganglions mésentériques de cobayes. En raison des petites dimensions de ces ganglions, nous nous vîmes forcé d'injecter à des lapins à la fois deux ou même trois ganglions entiers de cobayes, et de répéter ces injections au moins trois fois, avec huit jours d'intervalle entre deux injections.

Mais même en opérant ainsi, on obtient rarement un sérum qui détruise les leucocytes de cobayes dans les mêmes proportions et avec la même rapidité que cela s'observe pour les globules de lapins par leur leucotoxine spécifique.

Quelquefois, nous préparions la leucotoxine en nous servant de la moelle osseuse de lapins. Le sérum ainsi obtenu est très actif, mais il a l'inconvénient d'être en même temps très hémolytique; nous devons d'ailleurs remarquer que, même préparés avec les ganglions mésentériques, les sérums sont toujours légèrement hémolytiques, bien que l'émulsion originaire ne contienne macroscopiquement aucune trace de sang.

Les sérums leucotoxiques sont très peu stables; ils perdent *in vitro* leurs propriétés spécifiques encore plus facilement que les sérums hémolytiques. Le chauffage à 55° pendant une demi-heure leur fait perdre entièrement leur propriété dissolvante. Les ganglions mésentériques chauffés au-dessus de 60° ou traités par l'alcool absolu ne donnent pas lieu, en injections sous-cutanées, à la production des propriétés leucolytiques.

Les fonctions importantes qui sont dévolues dans l'économie aux globules blancs font que les sérums antileucocytaires constituent de véritables toxines pour l'animal sensible, cela va de soi. L'injection du sérum leucotoxique à un animal peut non seulement le rendre malade pendant un certain temps, mais est capable de le tuer plus ou moins rapidement, selon la force du sérum, sa quantité et le point d'inoculation — tout comme pour les autres toxines connues.

Cette ressemblance avec les toxines nous a engagé à immu-

niser les animaux — lapins et cobayes — contre leurs leucotoxines spécifiques; les résultats positifs de ces expériences, sur lesquels nous reviendrons tout à l'heure, fournissent une preuve de plus en faveur de l'analogie des leucotoxines avec les toxines d'origine microbienne.

Rien n'est plus facile que de déterminer la dose d'un sérum antileucocytaire mortelle en un temps donné.

Ce dosage doit être de préférence pratiqué avec des cobayes, et voici pourquoi : lorsqu'on injecte de la leucotoxine à un lapin, sous la peau ou dans la veine, il y a toujours, la dose fût-elle assez forte, une période d'incubation assez longue, qui dure parfois 6-8 jours, et pendant laquelle rien, dans l'aspect extérieur du lapin, ne prédit quel va être le résultat de l'inoculation — mort ou guérison.

Il en va tout autrement chez les cobayes; une injection intrapéritonéale fournit la réponse déjà dans les 24 heures, ou quelquefois au bout de quelques heures, si la dose est forte et le sérum fraîchement recueilli. Ceci a de l'importance, car en raison de la fragilité très grande de tous ces sérums, il est indispensable, avant chaque expérience, d'être renseigné aussi rapidement que possible sur ce que vaut un sérum au point de vue de sa toxicité.

Cette toxicité est très variable suivant les cas; ainsi, nous avons souvent opéré avec un sérum qui tuait un cobaye de 300-350 grammes, en injection intrapéritonéale, à la dose de 0,5 c. c. Avec 3 c. c. du même sérum, un cobaye du même poids mourait déjà après 3-4 heures. Dans ce dernier cas, aussitôt après l'injection, le cobaye se couche sur le ventre, son poil se hérisse, les selles sont souvent diarrhéiques, le ventre est ballonné et douloureux, l'animal se refroidit, la température rectale tombe au-dessous de 30°. A l'autopsie on constate une congestion intense de tous les viscères; la cavité péritonéale renferme un exsudat très abondant, limpide, très pauvre en éléments figurés et surtout en leucocytes; c'est à peine si l'on trouve dans un champ de microscope deux ou trois globules blancs, plus ou moins dégénérés, à côté d'un assez grand nombre de cellules endothéliales. Si la mort est rapide, le liquide péritonéal et le sang sont stériles.

Lorsque la dose de la leucotoxine n'est pas rapidement mor-

telle, et que le cobaye meurt seulement au bout de un ou plusieurs jours, alors on observe souvent un phénomène curieux qui consiste en ceci : la cavité péritonéale, dans laquelle fut injecté le sérum leucotoxique, est envahie par des microbes et devient en même temps le siège d'un afflux leucocytaire intense; quelquefois les leucocytes ont raison des microbes, et l'animal survit; plus souvent ce sont les microbes qui prennent le dessus, le liquide péritonéal devient louche, de consistance sirupeuse, en raison de l'immense quantité de microbes qu'il renferme; ceux-ci passent ensuite dans le sang, et le cobaye ne tarde pas à mourir d'infection généralisée. Comme on avait soin avant chaque expérience de s'assurer de la pureté du sérum employé, il faut admettre que les microbes en question arrivaient de l'intestin dans le péritoine, ce passage à travers la paroi intestinale étant favorisé par l'état d'infériorité des leucocytes, qui ne peuvent plus exercer leur vigilance habituelle.

Il nous reste à voir ce qui se passe dans la cavité péritonéale de cobayes lorsqu'on vient à leur injecter une dose de leucotoxine forte, mais non mortelle.

Aussitôt après l'injection, le cobaye devient sensiblement malade; tantôt il se couche, tantôt il reste immobile dans un coin de sa cage, en faisant de son corps des mouvements comme si le liquide injecté était très irritant. Malgré des symptômes inquiétants qui font d'abord prévoir une issue mortelle, le cobaye est déjà rétabli, quelques heures après l'injection, à tel point que rien dans son aspect extérieur ne révèle plus les changements morphologiques si intéressants que subit dans sa composition le liquide péritonéal.

Ces phénomènes péritonéaux, consécutifs à l'inoculation de faibles doses de leucotoxine, sont d'une portée théorique telle que nous n'hésitons pas à entrer à ce sujet dans quelques détails.

Prenons deux cobayes de même poids, injectons à un d'eux, dans la cavité péritonéale, une dose forte, mais non mortelle, de sérum leucotoxique (provenant du lapin); à l'autre, la même quantité de sérum, mais provenant d'un lapin neuf.

Dans le premier temps qui suit l'injection, dans l'un des cas comme dans l'autre, les phénomènes observés dans le péritoine se réduisent à ceci : le liquide péritonéal est limpide, très

pauvre en globules blancs et assez riche en cellules endothéliales desquamées ; au fur et à mesure que l'on s'éloigne du moment de l'injection : les cellules endothéliales deviennent plus rares. par contre, les leucocytes commencent à affluer en assez grand nombre.

Le lendemain de l'injection, celui des deux cobayes qui a reçu du sérum normal, présente un exsudat très riche en leucocytes, surtout en polynucléaires, et notablement plus riche qu'à l'état normal ; quant à l'autre cobaye, si la dose de la leucotoxine était forte, son liquide péritonéal est encore loin d'atteindre le lendemain le taux globulaire présenté par le témoin ; il est même au-dessous de la richesse moyenne d'un cobaye normal. Cet état de choses peut durer deux jours ; ce n'est qu'après cette période que la différence entre les deux cobayes devient tout à fait caractéristique.

Tandis que chez le cobaye injecté avec du sérum neuf le liquide péritonéal est revenu à l'état normal, le cobaye injecté de leucotoxine présente un exsudat dont la richesse leucocytaire devient de plus en plus prononcée.

De limpide qu'il est généralement, l'exsudat chez ce dernier cobaye devient louche, épais, visqueux, difficile à retirer au moyen d'un tube effilé ; sur les préparations colorées on voit des masses compactes de leucocytes — mononucléaires en grande partie — entassés les uns sur les autres. Et, fait remarquable, cette hyperleucocytose dans la cavité péritonéale n'est pas passagère, elle se maintient pendant plusieurs jours de suite, ce qui la distingue essentiellement de l'hyperleucocytose déterminée par les substances généralement employées à cet effet (bouillon, sérum, eau physiologique), qui ne se maintient pas au delà de 24 ou 48 heures. Au sixième jour encore, après l'injection de la leucotoxine, on constate souvent dans l'exsudat péritonéal un nombre inusité de leucocytes, tandis que chez le témoin tout est rentré depuis longtemps dans l'ordre.

On possède donc dans le sérum leucotoxique un moyen d'obtenir dans la cavité péritonéale un afflux leucocytaire qui est à la fois plus intense et plus durable que celui provoqué avec n'importe quelle autre substance connue jusqu'à présent.

Nous venons de dire que les deux premiers jours qui suivent l'injection de la leucotoxine, on observe généralement non une

augmentation, mais une diminution du nombre de globules comparativement à l'état normal.

Or cette hypoleucocytose initiale, qui plus tard fait place à une hyperleucocytose, n'a lieu qu'après la première injection de leucotoxine; lors de la seconde injection de la même dose de leucotoxine, on constate déjà dès le lendemain une hyperleucocytose des plus fortes, beaucoup plus forte que celle obtenue dans les mêmes conditions avec le sérum normal.

Le stade hyperleucocytaire, une fois établi, présente les mêmes caractères que nous venons de décrire il y a un instant à la suite de la première injection, c'est-à-dire qu'il se caractérise à la fois par son intensité et par sa longue durée.

Afin de juger du degré de l'hyperleucocytose produite par la leucotoxine, nous avons essayé à plusieurs reprises de faire une numération comparative des globules chez des cobayes injectés de sérum neuf, et injectés de sérum leucotoxique. L'opération n'est pas sans présenter certaines difficultés pour ce dernier cas, étant donnée surtout la consistance sirupeuse de l'exsudat, qui se refuse à monter dans le tube capillaire. Nous avons cependant réussi à pratiquer la numération dans plusieurs cas.

Voici quelques chiffres qui peuvent donner une idée approximative de la richesse globulaire observée dans le péritoine des deux sortes de cobayes.

Dans un cas, quatre jours après une deuxième injection de sérum normal (0,5 c. c.), nous avons trouvé 17,500 leucocytes par m. m. c., presque tous mononucléaires; chez le cobaye ayant reçu la même quantité (0,5 c. c.) de sérum leucotoxique, également la deuxième fois, le nombre de leucocytes était de 166,500 par m. m. c.

Après une troisième injection, les leucocytes ne cessent pas de se montrer sensibles à la leucotoxine et d'affluer en grand nombre dans le péritoine: témoins deux cobayes d'une autre série, qui ont été inoculés pour la troisième fois: un — de sérum normal, l'autre — de sérum leucotoxique; quatre jours après cette troisième injection, le témoin (sérum normal) avait 52,000 gl. par m. m. c., l'autre (sérum leucotoxique) en avait 462,000 par m. m. c.

Ces deux exemples peuvent suffire pour donner une notion

du degré d'excitabilité de l'appareil leucocytaire sous l'influence des doses non mortelles de leucotoxine.

L'expérience montre que l'on peut multiplier les injections péritonéales de leucotoxine chez le même cobaye sans faire disparaître la réaction si caractéristique des leucocytes; ainsi, même après la sixième injection de leucotoxine, il nous a été donné de constater une hyperleucocytose très manifeste avec ses caractères ordinaires, bien que la dose de leucotoxine injecté n'ait pas sensiblement varié d'une injection à l'autre.

Ceci est d'autant plus intéressant à noter que, déjà après deux ou trois injections de sérum leucotoxique, le sérum de cobaye acquiert des propriétés antitoxiques.

Lorsque trois semaines environ à partir de la première injection, on prélève chez le cobaye un peu de sang, on constate que celui-ci est franchement *antileucotoxique*: additionné de sérum leucotoxique en certaines proportions, il empêche la dissolution des globules blancs, tandis que la même quantité de sérum de cobaye normal n'empêche aucunement l'action dissolvante de la leucotoxine.

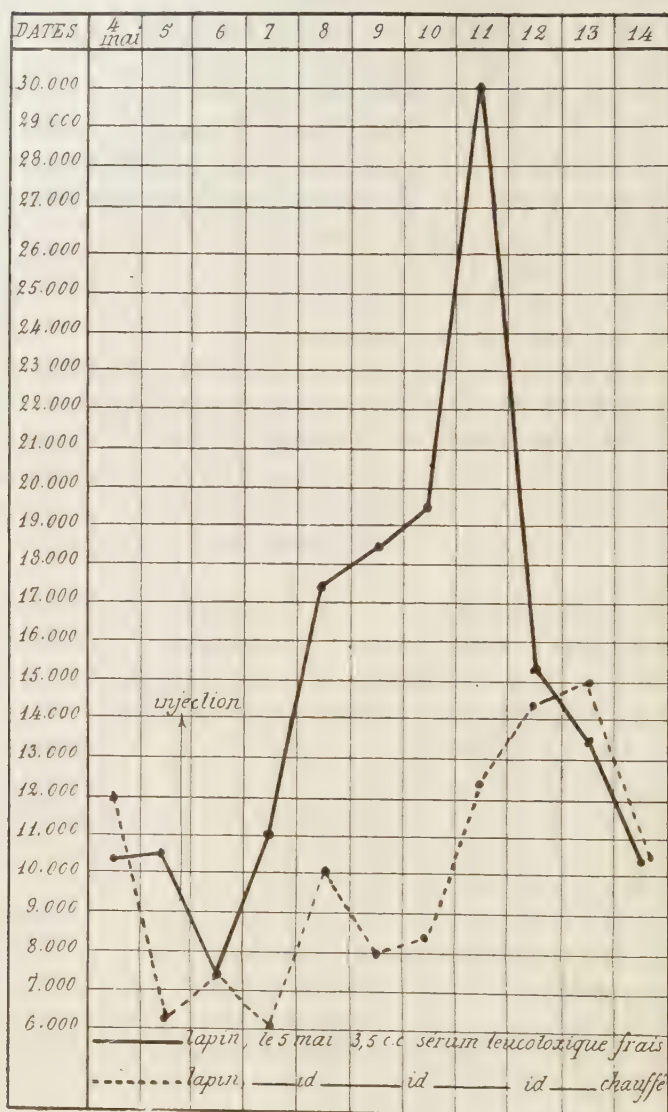
Nous laissons pour le moment de côté la question de l'antileucotoxine et de ses propriétés que nous nous réservons d'étudier plus tard. Ici nous voulons seulement souligner ce fait que, malgré la présence de l'antileucotoxine dans le sérum de cobayes, ceux-ci n'en cessent pas moins de réagir vis-à-vis de nouvelles injections de leucotoxine.

Jusqu'ici nous nous sommes servis de la cavité péritonéale de cobayes pour constater l'afflux leucocytaire qui suit l'injection de la leucotoxine.

Afin de s'assurer qu'il s'agit ici d'un phénomène d'ordre général, et aussi pour en donner une expression la plus mathématique possible, nous nous sommes adressé au lapin. Le riche réseau veineux qui couvre l'oreille des lapins se prête facilement à la numération de globules, même lorsque celle-ci doit être répétée 8 à 10 fois de suite.

Si la leucotoxine possède réellement le pouvoir d'exciter l'appareil leucocytaire, on devrait, avons-nous pensé, pouvoir produire une hyperleucocytose dans le système circulatoire par une injection sous-cutanée de leucotoxine, ce que les expériences ont en effet confirmé.

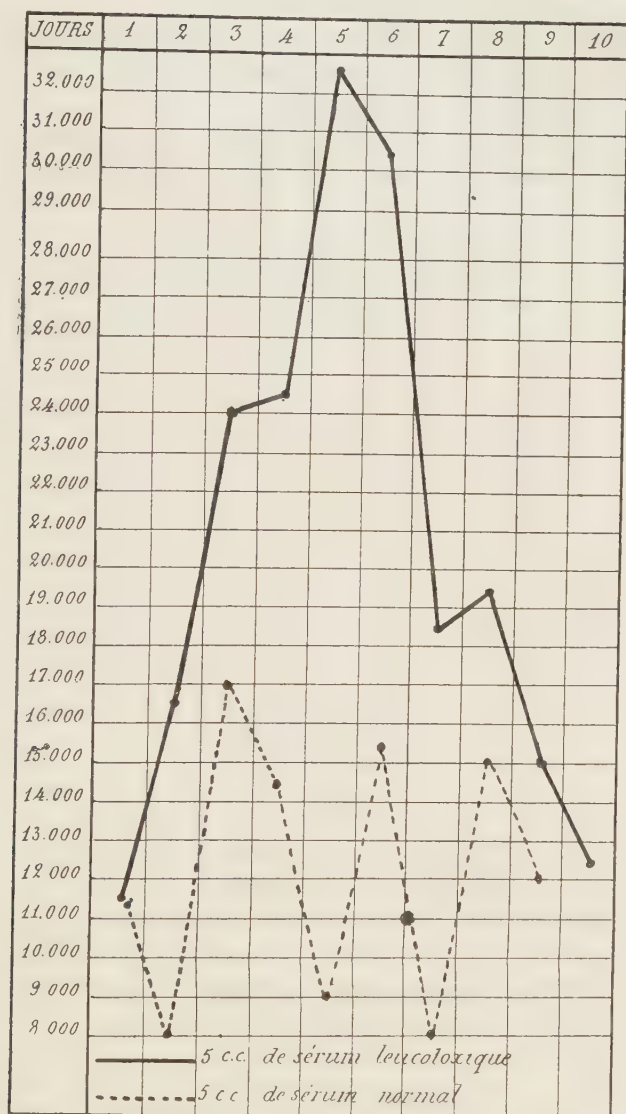
Lorsqu'on injecte *sous la peau* de lapin une dose forte, mais



Courbe n° 1.

non mortelle, de sérum leucotoxique — actif pour le lapin et fourni par le cobaye, — on constate dans le sang circulant, pendant plusieurs jours de suite, une augmentation considérable de

leucocytes, phénomène qui ne s'observe jamais au même degré



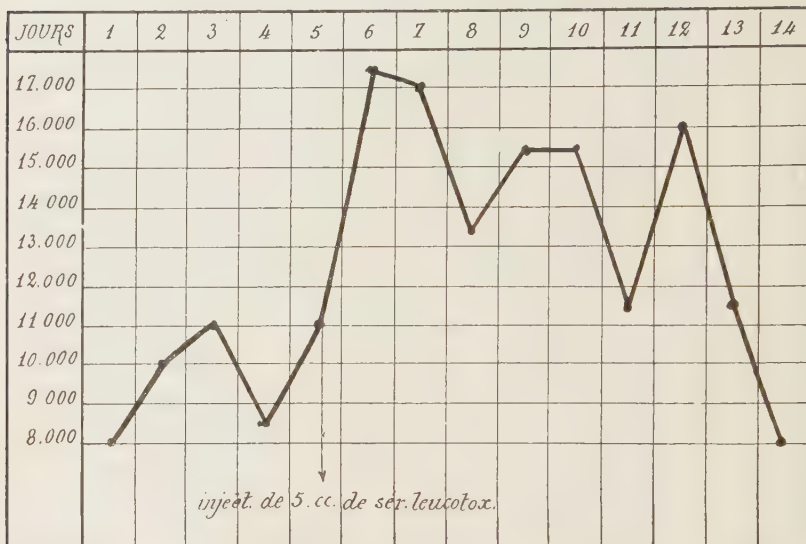
Courbe n° 2.

avec le sérum normal de cobaye. L'effet excitant de la leucotoxine devient surtout très manifeste lorsque, d'une part, on injecte à un lapin du sérum leucotoxique frais, et d'autre part, à un lapin

témoin, du même sérum, mais chauffé à 55° et par conséquent, privé de ses propriétés leucotoxiques.

Voici des courbes représentant les variations leucocytaires observées chez les lapins après injection de sérum leucotoxique frais et chauffé, et de sérum normal¹.

Il ressort de l'examen de ces courbes que les phénomènes que l'on constate chez le lapin après injection sous-cutanée sont



Courbe n° 3.

en tout comparables à ceux décrits précédemment au sujet d'injections intrapéritonéales chez le cobaye.

Quel que soit donc le point d'inoculation, l'animal — lapin ou cobaye — réagit toujours de la même façon, par un appel actif des leucocytes au point renfermant la leucotoxine.

Reste à déterminer la nature du facteur qui préside à ce phénomène.

Deux hypothèses peuvent être mises en avant : ou il s'agit d'une action directe de la leucotoxine sur l'appareil leucocytaire, ou bien d'une action indirecte par l'intermédiaire de l'antitoxine nouvellement formée.

1. Le sérum normal de cobaye donne parfois lieu à une légère hyperleucocytose non durable, due probablement à son faible pouvoir leucotoxique vis-à-vis des leucocytes de lapin.

Il est facile de prouver que la deuxième hypothèse est la moins probable ; d'abord, parce qu'encore longtemps avant l'apparition de l'antileucotoxine, on observe des phénomènes d'hyperleucocytose dans le péritoine de cobayes ; puis, si c'était la production de l'antileucotoxine qui déterminait l'afflux leucocytaire, celui-ci devrait être très prononcé lorsqu'on fait des injections de sérum antileucotoxique dans la cavité péritonéale d'un cobaye neuf.

Or, l'expérience montre qu'il n'en est rien ; le sérum antileucotoxique, injecté dans un péritoine de cobaye, donne lieu tantôt à une hypoleucocytose persistante, tantôt à une hyperleucocytose transitoire, comme si l'on avait injecté du sérum d'un animal normal.

Ce n'est donc pas grâce à la présence de l'antileucotoxine que l'animal soumis à l'injection de leucotoxine manifeste une suractivité leucocytaire. Si nous mettons hors de cause cette hypothèse, il nous reste l'autre qui est plus probable, c'est-à-dire que l'hyperleucocytose que nous avons étudiée est due à l'excitabilité directe que la leucotoxine détermine dans le système leucocytaire, et que cette excitabilité rentre dans la catégorie des phénomènes de chimiotaxie positive et négative, alternant pour la même substance selon la quantité du poison présent.

Cette suractivité leucocytaire peut-elle être utilisée par l'animal en vue d'une lutte plus efficace contre différentes maladies infectieuses ? C'est là une des questions dont l'étude est en ce moment activement poursuivie dans le laboratoire de M. Metchnikoff.

Recherches sur l'action de l'hémotoxine sur l'homme.

PAR MM. METCHNIKOFF ET BESREDKA

Lorsqu'il a été bien établi que de faibles doses de cytotoxines provoquent chez les animaux de laboratoire une stimulation considérable, il est devenu très important d'établir si cette règle s'applique également à l'homme. Dans l'étude de cette question, on a rencontré d'abord la difficulté d'essayer sur l'homme des substances nouvelles de nature toxique. Comme il est impossible de déterminer *a priori* la dose à la fois inoffensive et active sur l'organisme humain, on comprend facilement l'hésitation qu'on a dû éprouver avant de risquer les premières tentatives.

Une circonstance favorable a pu lever tous les obstacles. Les succès de la sérothérapie de la diphtérie ayant encouragé les entreprises dans cette voie, plusieurs médecins se sont mis à préparer des sérums contre diverses maladies humaines dont le microbe est encore inconnu, ou n'a pu être cultivé dans des milieux artificiels, la syphilis, par exemple, le cancer, la lèpre. Dans ce but on prélevait des parties malades, ou du sang et du sérum humain, qu'on introduisait dans le corps des animaux d'expérience. On suivait, par conséquent, la méthode qui sert actuellement pour préparer des cytotoxines. De toutes ces tentatives la plus intéressante est celle qui a été dirigée contre la lèpre.

L'extension de cette maladie dans beaucoup de pays, jointe à l'impossibilité de la guérir par aucun médicament connu, suggéra l'idée de chercher le remède dans un sérum antilépreux. C'est M. le Dr Carrasquilla, à Bogota, qui a ouvert cette voie et a préparé un sérum, en injectant à des gros animaux du sang et du sérum sanguin provenant de lépreux. Comme les malades avaient paru bénéficier du traitement par ce sérum, plusieurs autres léprologistes se mirent également à préparer des sérums semblables. Parmi ces médecins, nous devons citer notamment

M. Laverde qui, dans deux publications ¹, a donné beaucoup de détails importants sur la méthode de préparation du sérum antilépreux et aussi sur son action sur l'homme malade. Il injectait à des chevaux, ânes et brebis du sang entier, du sérum sanguin, du suc et des lépromes triturés, prélevés à des lépreux. Une fois, M. Laverde, au lieu de produits lépreux, injecta à une chèvre des fragments d'un épithélioma du col utérin. Le sérum fourni par tous ces animaux était injecté à des lépreux, le plus souvent à des doses de 10 à 20 c. c. à la fois.

M. Laverde, confirmant les données de son compatriote, M. Carrasquilla, signale chez ses malades une grande amélioration, allant quelquefois presque jusqu'à la guérison. Ses résultats ne pouvaient pas rester inaperçus ; on fit donc de nombreux essais de sérothérapie antilépreuse en Europe et dans des colonies. Lors du Congrès international des léprologistes à Berlin, en 1897, on a fait sur ce sujet plusieurs communications que nous devons résumer ici brièvement. Les rapports optimistes de MM. Carrasquilla et Laverde ont été confirmés par plusieurs autres léprologistes. MM. Buzzi, Abraham et Arning ² ont obtenu des améliorations manifestes et plus ou moins durables, qui ne pouvaient être attribuées qu'à l'action favorable des sérums employés. Bientôt après le Congrès, les médecins français de la Nouvelle-Calédonie furent tellement surpris, à la suite des injections du sérum de Carrasquilla, par l'amélioration considérable des lépromes, qu'ils se décidèrent à créer à Nouméa un service sérothérapique particulier ³.

Mais plusieurs autres savants, des plus autorisés, se sont nettement prononcés, au Congrès, contre la sérothérapie antilépreuse ⁴. M. Hallopeau n'a obtenu que des résultats peu marqués chez quelques lépreux, tandis que trois autres malades ne présentèrent absolument aucune amélioration de leur état. M. Dehio a déclaré que l'effet du traitement des lépreux dans les provinces baltiques en Russie, avec un sérum préparé sur place d'après la méthode de Carrasquilla, fut tout à fait nul. M. Brieger

1. Voir surtout ses travaux sur le traitement de la lèpre par la sérothérapie. Paris, 1897.

2. *Mittheilungen und Verhandlungen der internationalen wissenschaftlichen Lepra Conferenz*, Berlin 1898, t. II, pp. 37, 145, 148, 154, 156.

3. Auché. *La lèpre en Nouvelle-Calédonie*, Paris 1899.

4. *L. c.*, pp. 147, 151, 155, 156, 158. T. III, p. 599.

arriva à un résultat semblable, qu'il explique par l'absence de base scientifique de la méthode de Carrasquilla. Pour M. Brieger, l'injection aux animaux de sérum lépreux ne peut aboutir à aucun résultat, parce que ce sérum est rapidement éliminé de l'organisme. On ne sait même pas si le sérum antilépreux renferme des toxines ou des antitoxines. M. Neisser, qui a une si grande part dans nos connaissances actuelles sur la lèpre, se rallie à l'opinion de M. Brieger, et insiste sur le peu d'espoir qu'on doit avoir en une sérothérapie de la lèpre. On n'a même pas le droit d'affirmer, d'après lui, que le sérum des animaux, traités avec des produits lépreux, possède des qualités particulières.

Ces échanges d'opinions n'ont pas seulement leur valeur, mais peuvent servir encore pour mettre en relief, dans un cas tout spécial, l'importance de la découverte des cytotoxines. Maintenant que nous savons que l'injection du sérum, du sang ou d'autres éléments cellulaires à un animal provoque la formation des cytotoxines, personne ne pourra plus soutenir l'absence de changements survenus dans l'organisme des animaux traités par des produits lépreux. Les sérums, préparés d'après les méthodes de Carrasquilla et Laverde, contiennent sûrement une ou plusieurs cytotoxines. Les sérums, obtenus après l'injection du sérum des lépreux ou du suc et des produits des lépromes, doit inévitablement contenir de la leucotoxine humaine. Les sérums obtenus par M. Laverde, chez ses animaux injectés avec du sang entier de lépreux, doit, en dehors de la leucotoxine, renfermer encore une grande quantité d'hémotoxine. Aussi il n'est pas étonnant que dans quelques cas, après des injections de doses fortes et répétées, M. Laverde obtint un effet nuisible (quoique passager) qui se manifesta entre autres par « des symptômes visibles d'anémie, due probablement à la dissolution des globules rouges du sang ». (*L. c.*, p. 21.)

Mais, tandis que les sérums préparés pour combattre la lèpre renferment sûrement des cytotoxines, il est impossible d'admettre qu'ils contiennent des produits lépreux intacts ou modifiés. M. Brieger, au Congrès de 1897, a insisté déjà sur l'absence d'une toxine lépreuse dans le sang des malades. Les bacilles eux-mêmes sont absents ou très rares dans ce milieu. Mais, et cet argument est décisif, M. Laverde a obtenu le même

degré d'amélioration avec des sérums, préparés par des injections de sang lépreux ou des lépromes, et avec un autre sérum, préparé avec un épithélioma du col de l'utérus. La chèvre qui avait été traitée avec cette tumeur, ne pouvait nullement recevoir de produits lépreux, mais elle renfermait sûrement des cytotoxines humaines. C'est donc à ces poisons cellulaires qu'il faut attribuer les améliorations, observées par tant d'observateurs, chez les lépreux soumis à la sérothérapie, améliorations dont il est impossible de nier la réalité. En faveur de cette thèse plaident non seulement les succès, mais aussi les échecs du traitement de la lèpre par les sérums cytotoxiques. On sait que, contrairement aux antitoxines, les toxines en général et notamment les cytotoxines sont des corps très peu stables. Elles s'atténuent ou se détruisent avec le temps, et sont facilement altérées par toute sorte de facteurs. La conservation prolongée et le voyage de Colombie en Europe, ou l'addition d'acide phénique à des sérums fraîchement préparés, (comme dans le cas de M. Dehio) peuvent sensiblement affaiblir ou totalement éliminer les cytotoxines, et il n'est point étonnant que dans ces conditions leur effet soit nul.

Toutes ces considérations nous ont amené à cette supposition que l'effet favorable du traitement des lépreux par des sérums doit être attribué non à des produits quelconques du bacille de Hansen, mais à des cytotoxines, développées dans l'organisme animal à la suite d'injections du sang ou des tissus humains. D'un autre côté, les recherches nombreuses exécutées par des léprologistes avec des sérums sûrement cytotoxiques, nous ont conduit à ce résultat que des essais d'injections de sérums hémotoxiques et leucotoxiques peuvent être tentés sur l'homme.

Dans cet espoir, nous nous sommes mis à préparer, à partir du commencement de l'année courante, une chèvre avec du sang défibriné¹. Après 36 jours de ce traitement, le sérum sanguin de la chèvre s'est montré incomparablement plus agglutinant et hémolytique qu'il n'était avant la première injection du sang humain. Ainsi 10 volumes de sérum, pris avant le traitement, n'étaient pas capables d'agglutiner ni de dissoudre les

1. Ce sang provenait de malades du service de M. le Dr Vaquez (auquel nous exprimons nos vifs remerciements) ou bien du placenta des femmes accouchées.

hématies contenues dans 1 volume de sang humain après 1 h. 20 de contact, tandis que, après avoir reçu en tout 34 c. c. de sang humain, un volume de sérum agglutinait, dans un volume de sang, toutes les hématies au bout de quelques secondes, et les dissolvait totalement en 7 minutes. C'est avec ce sérum hémolytique que nous avons fait notre première injection à l'homme. Nous avons demandé à MM. les docteurs Hallopeau et Ducastel de nous permettre d'injecter quelques-uns des lépreux de leurs services. Ces savants ont consenti d'autant plus volontiers que, dans l'intérêt de leurs malades, il est très important d'établir les propriétés des substances qui se trouvent dans les sérums qu'on prépare avec des produits humains, et qu'on injecte dans l'intention de guérir la lèpre.

Pour commencer, nous avons pendant plusieurs jours déterminé le nombre de globules rouges et la quantité d'hémoglobine dans le sang de deux lépreux adultes de sexe masculin, atteints de lèpre tuberculeuse à un degré assez avancé ¹. Le sixième jour après la première prise de sang, nous injectâmes à l'un de nos malades 0,5 c. c. de sérum de la chèvre préparée (chèvre n° 1) et à l'autre 0,5 c. c. de sérum d'une vieille chèvre n° 2), qui n'avait jamais été traitée avec du sang humain, mais dont le sérum s'est montré tout de même un peu hémolytique pour l'homme ².

Nous avons pensé que de si petites doses, sûrement incapables d'occasionner le moindre inconvénient à nos malades, ne seraient pas non plus capables de produire un changement tant soit peu notable dans la teneur du sang en globules rouges et en hémoglobine. Et cependant l'observation, poursuivie pendant plusieurs jours, nous montra que dans les deux cas il s'est produit une augmentation d'hématies très marquée, et aussi un certain accroissement dans la quantité d'hémoglobine. Ce premier résultat nous engagea à continuer l'injection des petites doses (1 à 3 c. c.) des mêmes sérums. Dans la suite nous pûmes facilement constater que même le sérum plus fort de la chèvre pré-

1. Toutes nos numérations des hématies ont été exécutées avec l'hématimètre de M. Malassez (modèle modifié par son auteur) et le titrage d'hémoglobine avec l'appareil de Gowers, de Berne.

2. Dans un mélange de 2 volumes de sérum de la chèvre n° 2 avec 1 volume de sang humain les hématies sont rapidement agglutinées, mais leur dissolution est partielle, même après 45 heures.

parée (n° I) ne produisait aucun symptôme fâcheux et était très bien supportée par nos malades.

Nous prîmes donc la décision de n'injecter que du sérum de la chèvre n° I. Ces injections ont été faites à plusieurs reprises pendant plus de trois mois (v. l'Appendice, n°s I et II). La dose la plus forte n'était que de 7 c. c. Les deux malades affirmèrent avoir ressenti une douleur quelquefois assez vive, mais toujours de courte durée, après quelques injections du sérum de la chèvre n° I. En même temps ils déclarèrent se sentir mieux au point de vue des douleurs névralgiques. Un des deux lépreux notamment, qui devait souvent recevoir des piqûres de morphine pour calmer ces douleurs, bientôt après le commencement du traitement par le sérum, put se passer des injections calmantes de l'alkaloïde. D'un autre côté, quelquefois, à la suite du sérum, il se produisait autour de quelques lépromes, parmi les plus récents, une congestion intense avec suppuration abondante. Dans ce pus l'examen bactériologique ne révélait qu'une grande quantité de bacilles lépreux, contenus dans l'intérieur des phagocytes, et aucun autre microbe.

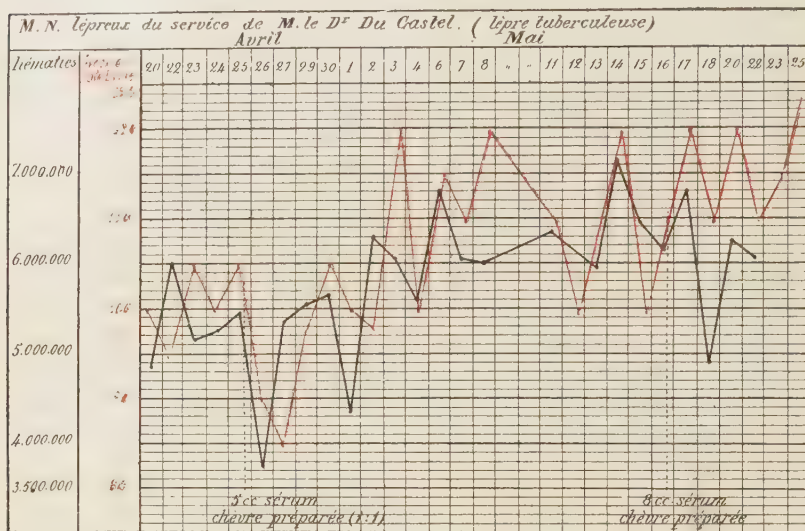
La suppuration aboutissait à la formation d'une eschare qui se détachait dans la suite. Ces phénomènes rappellent les changements, décrits par les léprologistes qui avaient pratiqué le traitement par les sérums antilépreux de Carrasquilla et Laverde. Ainsi M. Arning a été frappé de l'amélioration dans l'état de son malade, accompagnée d'ulcération des nodules lépreux, avec écoulement d'un pus ne renfermant que des bacilles de Hansien. Ces ulcérations guérirent avec une grande rapidité.

Le mouvement fébrile chez nos malades était rare, insignifiant et de courte durée.

Quoique l'effet favorable du sérum sur la lèpre fût dans nos cas beaucoup moins prononcé que dans les exemples décrits par Carrasquilla et Laverde, néanmoins on a le droit de conclure que la réaction de leurs sérums et des nôtres présentait une grande analogie. La différence de degré s'explique facilement par la quantité de sérum beaucoup plus faible que nous injectons à nos malades. Au lieu de commencer par 10 et même 20 c. c., comme le faisait le Dr Laverde, nous injectons de 0,5 à 7 c. c. de notre sérum.

Les faits que nous venons de résumer constituent donc un

nouvel argument en faveur de notre thèse, que l'amélioration qu'on obtient chez des lépreux, avec des sérums, est due non à des produits du bacille de Hansen, mais bien aux cytotoxines que renferment ces sérums. Parmi ces poisons cellulaires, la première place doit être attribuée à la leucotoxine. On a constaté

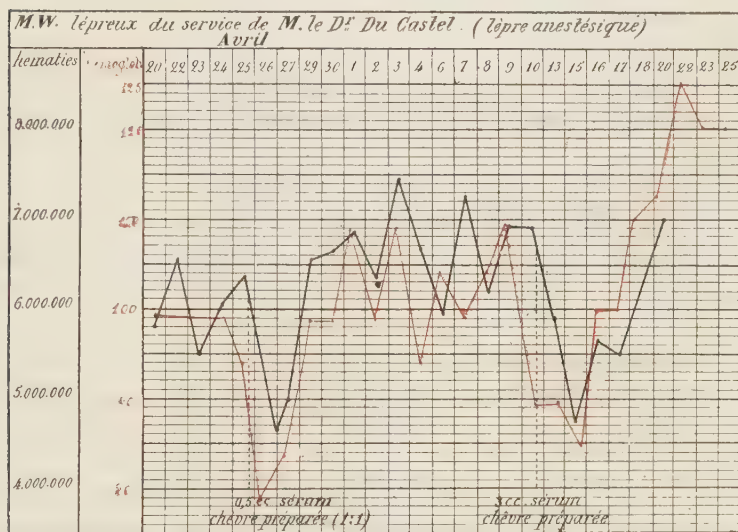


Tracé n° 1.

le même degré d'amélioration chez des lépreux, traités avec du sérum des animaux, préparés avec du sang entier, et chez des malades, inoculés avec du sérum, préparé exclusivement avec du sérum sanguin de l'homme. Eh bien, le premier sérum doit renfermer beaucoup et le deuxième sérum très peu ou pas du tout d'hémolysine. Ce n'est donc pas ce poison qui agit contre la lèpre. Par contre, dans les sérums, obtenus après des injections du sang entier ou seulement du sérum sanguin, il se développe à peu près la même quantité de leucotoxine¹. Comme le sérum de notre chèvre n° 1 a manifesté une action analogue, quoique moindre, sur les lépromes, il a fallu établir si lui aussi renferme de la leucotoxine humaine. L'examen direct nous a révélé que dans le mélange d'un volume de ce sérum avec la

1. Voir à ce sujet les faits rapportés par M. Delezenne dans sa première note sur le sérum leucolytique, dans les *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 2 avril 1900.

même quantité de sang humain, les leucocytes sont détruits après un quart d'heure. Ils sont devenus ronds et transparents et leur noyau très visible. Dans le sérum d'une chèvre neuve, les leucocytes humains, même au bout de 3 heures, ont conservé leur aspect normal.



Tracé n° 2.

Dans le courant de nos observations, nous avons suivi les variations quotidiennes du taux des globules rouges et d'hémoglobine chez les deux lépreux. Sous ce rapport le résultat a été des plus concluants. Les injections répétées des petites doses du sérum hémolytique augmentent l'hématopoïèse, d'une façon analogue à ce qui a été établi par M. Cantacuzène pour le lapin. Comme il a été depuis longtemps constaté par plusieurs hématalogues, c'est l'hémoglobine qui donne des résultats plus constants et plus précis que les hématies. Cette conclusion découle aussi de nos observations.

Cinq semaines après les premières injections de sérums hémolytiques à nos deux lépreux, nous leur avons prélevé un peu de sang, dans le but de rechercher si leur sérum a acquis une propriété antihémolytique. Le résultat fut positif. Le sérum des deux malades a manifesté une action nettement antitoxique

vis-à-vis de l'hémotoxine humaine. Cette action a été plus forte que celle du sérum humain normal. Le sérum du premier des lépreux (qui reçut plus de sérum de la chèvre n° 1) s'est montré plus antihémolytique que celui du second malade, injecté souvent avec le sérum de la chèvre n° 2. Eh bien, malgré ce pouvoir antitoxique du sang, nos lépreux continuèrent à réagir, après des nouvelles injections de sérum, par l'augmentation de l'hématopoïèse.

Un troisième lépreux, dans un état très avancé, exigeait encore beaucoup plus de ménagements et de prudence que les deux premiers. Nous nous décidâmes par conséquent à ne lui injecter pendant plusieurs semaines que du sérum faiblement hémolytique de la chèvre n° 2, de 0,75 c. c. à 3 c. c., après quoi nous lui fîmes une injection d'un demi c. c. et plus tard d'un c. c. de sérum de la chèvre n° 1. Ici encore l'accroissement de l'hématopoïèse, surtout pour ce qui concerne l'hémoglobine, s'est manifesté d'une façon non douteuse. Mais, bien entendu, chez ce malade il n'a pu être question d'influencer tant soit peu son processus lépreux très avancé, avec les doses minimales de sérums hémolytiques.

Un quatrième lépreux du service de M. Hallopeau, un Canaque, atteint de lèpre tuberculeuse avancée, n'a pu recevoir qu'une seule injection, vu l'état précaire de sa santé générale. Il n'a pu, par conséquent, nous fournir aucun résultat dans nos recherches.

En résumant les conclusions principales qui découlent de nos premiers essais d'injections de sérums cytotoxiques chez l'homme, nous devons considérer d'abord comme très probable que l'effet favorable des sérums antilépreux doit être attribué à la leucotoxine. Celle-ci se développe à la suite de l'introduction dans l'organisme animal de produits leucocytaires humains. La leucotoxine, injectée à dose convenable, doit produire une excitation du système phagocytaire, analogue à celle qui a pu être démontrée par les expériences directes de l'un de nous (Besredka) sur les lapins et les cobayes. Il est extrêmement probable que cette excitation contribue à une réaction phagocytaire plus active vis-à-vis du bacille lépreux, réaction qui se traduit par une suppuration et une élimination abondante de

ces microbes. L'hémotoxine ne doit au contraire jouer aucun rôle favorable dans la lèpre, et son action hémolytique empêche l'emploi des doses suffisantes de sérum. Il en résulte que les sérums antilépreux doivent être préparés dorénavant non plus avec du sang entier, mais seulement avec du sérum sanguin ou, mieux encore, avec des ganglions lymphatiques d'homme, injectés à des animaux. C'est ce que nous essayons à réaliser dans le but d'obtenir un sérum leucotoxique efficace.

Nos injections à des lépreux ont démontré l'accroissement de l'hématopoïèse, à la suite de petites doses répétées de sérum hémolytique. Ce résultat, présentant une grande importance au point de vue général, a dû être vérifié par une expérience rigoureuse. Après avoir établi qu'on peut sans le moindre danger injecter d'emblée plusieurs c. c. de sérum de la chèvre n° 1, nous nous sommes décidés à faire un essai comparatif sur l'effet de doses faible et moyenne. Deux lépreux du service de M. le Dr Ducastel, à Saint-Louis, encouragés par l'exemple des malades du service de M. le Dr Hallopeau, ont manifesté le désir d'être à leur tour inoculés avec notre sérum. Le premier, atteint d'une lèpre anesthésique contractée à la Guadeloupe, reçut, après qu'on eût déterminé pendant 5 jours son taux normal de globules rouges et d'hémoglobine, un $1/2$ c. c. de sérum n° 1. Le second, un lépreux tuberculeux avancé, fut en même temps injecté avec 5 c. c. du même sérum. Chez les deux malades il se produisit d'abord une diminution considérable d'hématies et d'hémoglobine, qui persista peu de jours. Les deux valeurs remontèrent bientôt à la normale et la dépassèrent, d'une façon plus forte chez le deuxième lépreux. Il suffit de jeter un coup d'œil sur les deux courbes 1 et 2 pour se rendre compte de l'effet produit par la première injection de sérum. Chez le lépreux qui avait reçu la faible dose, l'augmentation de l'hématopoïèse s'est maintenue pendant quelques jours pour faire place à des valeurs voisines de la normale. Chez le second, injecté avec une plus forte dose de sérum, l'accroissement de l'hématopoïèse a pu au contraire, être constatée pendant deux semaines, sans compter les faibles oscillations dans la quantité d'hématies et d'hémoglobine.

Lorsque chez le premier lépreux il se manifesta un abaissement de l'hématopoïèse d'une façon suffisamment nette, on lui

fit une seconde injection du même sérum, en quantité de 3 c. c.. Celle-ci fut encore suivie d'une chute assez marquée d'hématies et d'hémoglobine, mais six jours après, ces éléments commencèrent leur ascension qui dépassa celle qui était survenue après la première injection. En étudiant la courbe n° 1, il est impossible de méconnaître le rapport étroit et causal entre l'introduction de sérum et les variations de l'hématopoièse. Cette conclusion est corroborée par les chiffres, recueillis chez notre second lépreux. On lui fit une deuxième injection (8 c. c.) au moment où le nombre de globules rouges était encore assez élevé et la quantité d'hémoglobine considérable. Eh bien, malgré cette circonstance, capable de masquer le résultat, la seconde injection fut suivie d'un accroissement encore plus considérable d'hémoglobine. Les globules rouges, élément en général bien moins précis que l'hémoglobine, pendant les premiers jours après la deuxième injection, accusent plutôt une diminution passagère.

Les deux derniers lépreux qui servirent pour contrôler les résultats, obtenus précédemment, ont donc fourni une confirmation nouvelle de cette règle générale que *les faibles doses de cytotoxines produisent une suractivité des éléments cellulaires correspondants*. En présence de ce fait, nous avons jugé utile de communiquer dès à présent nos observations, sans attendre la fin de nos autres recherches dans la voie ouverte par la découverte des poisons cellulaires.

D'après tout ce qui a été dit, il est tout naturel de se poser les questions suivantes : comment agissent les sérums leucotoxiques, dépourvus d'hémotoxine, sur certaines maladies chroniques et rebelles, comme la lèpre ? Les sérums hémotoxiques sont-ils capables d'augmenter aussi l'hématopoièse chez des personnes atteintes d'anémies diverses ? Ces questions, comme une série d'autres qui s'y rattachent, sont en ce moment à l'étude à l'Institut Pasteur.

En terminant cette note, nous exprimons nos plus vifs remerciements à M. le Dr Hallopeau, qui nous a autorisé à faire des injections et à travailler dans son service à Saint-Louis, et à M. le Dr Ducastel, qui a mis à notre disposition deux de ses malades.

APPENDICE I.

M. M., 42 ans, lépreux du service de M. le Dr Hallopeau.

Nombre d'hématies d. un			Avril.		
Dates.	mill. c.	Hémog.	Injection.		
Février. en millions					
14	6,30	73		1 5,92	410
17	6,09			2 5,28	410
19	6,20	80	0,5 c.c. sér. n° I.	3 6,20	410
20	7,50			4 6,44	410
21	6,30	88		5 "	400
22	5,70			6 6,30	420
23	6,36		1 c.c. sér. n° I.	8 5,86	405
24	5,80			9 6,38	400
25	5,38			10 6,06	405
26	6,26			11 5,96	97
27	5,78			12 4,96	105
28	6,80			13 6,46	405
Mars.				15 5,58	105
1	6,20			16 4,92	105
2	5,48			17 5,96	105
3	5,86			18 6,34	105
4	5,90		1 c.c. sér. n° I.	19 6,04	400
5	5,44			20 5,58	402
6	8,30			22 7,20	415
7	5,96			23 5,68	445
8	5,76			24 6,00	410
9	6,30			25 6,72	410
10	6,14			26 6,54	90
11	5,30			27 6,34	90
12	5,88			29 5,94	120
13	6,42	85		30 "	400
14	5,26		2,5 c.c. sér. n° II.	Mai.	
15	4,92			1 6,94	405
16	5,84			2 6,26	95
17	5,88	98		3 6,48	418
18	5,12			4 6,42	405
19	6,30			6 6,46	410
20	5,18			7 6,32	410
21	5,46		3 c.c. sér. n° II.	8 6,18	410
22	6,30			9 5,30	410
23	5,52			10 6,40	100
24	5,36			11 6,82	95
25	4,82			13 5,76	90
26	5,84	100		14 7,06	445
27	6,16			15 6,22	405
28	5,86			16 6,46	405
29	5,30	95	4 c.c. sér. n° I.	17 5,98	445
30	5,98			18 6,54	420
				20	440
				22	95
				23	415

APPENDICE II.

M. B., 34 ans, lépreux du service de M. le Dr Hallopeau.

Février.			24 5,60	
14	6,02	82	25 7,08	95
17	5,52		26 7,16	
19	5,14	82	27 6,82	
20	6,90		28 6,88	
21	6,98	80	Mars.	
22	6,44		1 7,48	
23	7,47		2 4,92	

Nombre d'hématies d. un mil. c.				Nombre d'hématies. d. un mil. c.			
Dates.	Hémog.	Injections.		Dates.	Hémog.	Injections.	
3	5,60	1 c.c. sér. n° II.		42	6,90	100	
4	5,94			43	6,54	95	
5	5,38			45	7,06	90	
6	6,08			46	5,34	95	4 c.c. sér. n° I.
7	5,78			47	7,72	110	
8	6,24			48	6,52	110	
9	6,54			49	5,68	95	
10	5,66			20	7,36	110	
11	5,84			22	5,38	95	
12	6,58	105		23	6,50	115	
13	5,54			24	6,12	109	
14	5,78			25	6,00	110	
15	5,92			26	5,64	90	
16	5,50			27	5,32	90	
17	5,90	85		28	7,12	115	
18	7,70			30		95	
19	5,94						
20	6,26			Mai.			
21	4,54			1	6,24	95	
22	5,58	90		2	6,84	95	
23	5,80			3	6,56	105	
24	4,68			4	5,32	90	
25	4,08			6	6,72	100	
26	6,14			7	6,70	100	
27	4,78	80		8	6,38	95	7 c.c. sér. n° I.
28	5,94			9	7,28	115	
29	6,18			10	6,94	100	
30	6,10		1 c.c. sér. n° I.	11	6,04	90	
				13	5,90	90	
Avril.				14	7,90	110	
1	6,44	85		15	5,58	100	
2	5,54	90		16	7,26	95	
3	4,20	100		17	6,42	95	
4	5,48	105		18	7,16	100	
5	4,96	85		20		100	
6	6,80	95		22		90	
10	5,72	90		23		95	
11	5,74	95					

NOTE SUR L'ÉLIMINATION DES BACTÉRIES

PAR LES REINS ET LE FOIE

PAR LE D^r MÉTIN

Médecin principal des colonies.

La question de l'élimination des bactéries par les organes glandulaires a été l'objet d'assez nombreux travaux, dont on trouvera l'historique détaillé dans le numéro XXXIII, 2, du *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*. Tous les auteurs s'accordent à reconnaître que les glandes salivaires normales sont imperméables aux microorganismes ; mais ils diffèrent d'avis pour ce qui concerne le foie et les reins.

Les uns, parmi lesquels Bield et Krauss, Pawlosky, prétendent que les reins et le foie laissent passer tous les corps étrangers qui circulent dans le sang, alors même qu'il n'y a pas d'altération dans la structure de ces organes.

Les autres, avec Wyssokowitch, Opitz, Carl et Klecki, arrivent au contraire à cette conclusion que s'il y a élimination des bactéries par les urines ou par la bile, cela est dû nécessairement à des modifications survenues dans les parois vasculaires du rein ou du foie.

En d'autres termes, l'élimination des bactéries serait pour les uns une fonction physiologique, et pour les autres un phénomène d'ordre pathologique.

Sur les conseils et les indications de MM. Roux et Metchnikoff, que nous prions d'agréer l'expression de notre profonde reconnaissance, nous avons institué deux séries d'expériences pour la solution de cette question d'un si grand intérêt théorique et pratique. Dans l'une, nous nous sommes servi du lapin, à qui nous inoculons dans les veines du *b. subtilis*, du *staphylococcus aureus*, du pyocyanique, du *b. prodigiosus*, du *bacillus anthracis*, ou du bacille typhique. Dans l'autre, nous nous sommes adressé au cobaye, et nous avons employé la voie sous-cutanée et les mêmes microbes. Au début, nous nous servions de cultures en bouillon de ces diverses bactéries ; mais nous avons peu après

remplacé ce liquide par une dilution en eau physiologique de corps microbiens cultivés 24 heures sur gélose. Nous raclions un tube de gélose et nous mélangions le produit du raclage dans 10 c. c. d'eau physiologique. Les doses ont varié de 1/5 de c. c. à 2 c. c. sans que les suites aient été différentes.

Dans ces recherches nous sommes arrivé tout d'abord à des résultats contradictoires ; mais un examen attentif nous a prouvé que c'était une question de technique. Que l'on puise l'urine par le cathétérisme de l'urètre, ou par celui de l'urétére, ou qu'on l'aspire directement dans la vessie par la ponction au moyen de l'aiguille de la seringue chez l'animal vivant ou sur le cadavre, il est absolument nécessaire d'opérer d'une façon telle qu'il ne se trouve pas de sang, en si petite quantité que ce soit, dans l'urine ainsi puisée. Si le cathétérisme a éraillé la muqueuse, ou si l'aiguille, en ponctionnant la vessie, a traversé un capillaire, l'urine recueillie amène avec elle une quantité de sang, infime à la vérité, mais suffisante pour donner lieu quelquefois à une culture du microbe qu'on avait préalablement introduit dans l'organisme. Dans ces conditions on serait tenté de conclure à l'élimination physiologique des bactéries, le microscope ne décelant aucune altération vasculaire dans les vaisseaux du rein.

Après de nombreux tâtonnements, nous sommes arrivé à procéder de la façon suivante :

Chez l'animal vivant, nous faisons une laparotomie permettant d'attirer en dehors la vessie, que nous laissons reposer sur du papier stérilisé pendant la durée de l'expérience. Pour puiser l'urine au moyen de la seringue stérilisée, nous choisissons un endroit paraissant peu vascularisé, et nous faisons la ponction avec une aiguille très fine après avoir eu soin de brûler avec un fer rouge la paroi vésicale, pour être sûr de rétracter les capillaires qui auraient pu se rencontrer sur notre route. L'animal qui nous avait ainsi servi pour quelques prises d'urine était sacrifié vers la deuxième heure après le début de l'expérience.

Chez le cadavre, nous ouvrons largement la vessie au moyen d'un scalpel rougi au feu, et, les deux lèvres de la plaie étant écartées par des pinces, nous aspirons l'urine au moyen d'une pipette mousse, stérilisée. Nous procédions de cette façon pour recueillir la bile.

Nous avons ainsi puisé de la bile ou de l'urine à des intervalles divers après l'injection des bactéries, à partir d'un quart d'heure jusqu'à 26 heures. Nousensemencions la bile ou l'urine sur gélose, répartissant invariablement 10 gouttes de liquide sur un tube à chaque expérience.

Les résultats de nos expériences sont consignés dans les tableaux suivants :

B. Subtilis.

Lapin 1. — Reçoit dans la veine 1 c. c. de culture en bouillon de *bacillus subtilis* de 24 heures. Aux intervalles ci-après, prise directe de l'urine par ponction de la vessie après laparotomie et cautérisation ignée de la paroi vésicale.

	X gouttes d'urine.	X gouttes de bile.	Observations.
15 minutes après l'injection.	0	»	
1/2 heure —	0	»	
1 heure —	0	»	
2 heures —	0	0	{ L'animal est sacrifié pour cette expérience.

Lapin 2. — Mêmes détails que ci-dessus.

	X gouttes d'urine.	X gouttes de bile.	
3 heures après l'injection.	0	»	
4 heures —	0	»	
5 heures —	0	0	Même observation.

Lapin 3. — Mêmes détails.

10 minutes après l'injection, le lapin est sacrifié, et l'urine et la bile sont retirées avec les mêmes précautions que dans les expériences précédentes. Les tubes d'ensemencement restent stériles.

Lapin 4. — Cet animal reçoit dans la veine 5 c. c. de culture en bouillon de *b. subtilis* âgée de 24 heures.

24 heures après l'injection, prise de l'urine après laparotomie et avec les mêmes précautions : les tubes d'ensemencement restent stériles. 26 heures après l'injection, le lapin est sacrifié : l'urine et la bile recueillie avec le procédé ci-dessus ne donnent aucune culture.

Staphylococcus aureus.

Lapin 5. — On inocule à ce lapin, dans la veine de l'oreille, 2 c. c. de culture en bouillon de *staphylococcus aureus* âgée de 24 heures. L'urine est retirée par cathétérisme de l'urètre aux intervalles suivants :

	Urine.	Bile.	Observations.
10 minutes après l'injection.	0	»	
20 — —	0	»	
30 — —	4 colonies	»	{ L'urine est légèrement teintée de sang.
1 heure après l'injection.	0	0	{ Pour cette expérience l'animal est sacrifié et l'urine prise directement dans la vessie.

Dans cette expérience, nous voyons qu'une demi-heure après l'injection nous avons obtenu 4 colonies de staphylocoque; mais à l'autopsie de l'animal sacrifié, 1 heure après l'injection, nous voyons dans l'urètre une petite éraillure produite par le cathétérisme; d'ailleurs l'urine ensemencée renfermait quelques globules sanguins. L'urine prélevée directement dans la vessie aussitôt après avoir sacrifié l'animal était stérile.

Lapin 6. — Même dose injectée. L'urine est puisée directement dans la vessie après laparotomie, et après cautérisation de la paroi vésicale.

	<i>Urine.</i>	<i>Bile.</i>	<i>Observations.</i>
10 minutes après l'injection.	0	»	
30 — — —	0	»	
1 heure — —	0	»	
2 heures — —	0	»	{ Pour cette expérience le lapin est sacrifié.

Lapin 7. — Mêmes détails que pour le précédent.

	<i>Urine.</i>	<i>Bile.</i>	
4 heures après l'injection.	0	»	
5 — — —	0	»	
6 — — —	0	0	{ Pour cette expérience le lapin est sacrifié.

Charbon.

Lapin 8. — On injecte dans la veine de ce lapin 1/5 de c. c. d'une émulsion en eau physiologique de culture de charbon sur gélose : 1 tube pour 10 grammes d'eau. L'urine est puisée directement dans la vessie après laparotomie et cautérisation de la paroi vésicale.

	<i>Urine.</i>	<i>Bile.</i>	
10 minutes après l'injection.	0	»	
20 — — —	0	»	
30 — — —	0	»	
1 heure — —	0	0	{ Pour cette expérience le lapin est sacrifié.

Lapin 9. — Mêmes détails.

15 minutes après l'injection, le lapin est sacrifié : La bile et l'urine ne donnent aucune culture.

Lapin 10. — Mêmes détails.

	<i>Urine.</i>	<i>Bile.</i>	
24 heures après l'injection.	nombreuses	»	L'urine est sanguinolente.
26 — — —	—	—	—
27 — — —	—	0	{ Pour cette expérience le lapin est sacrifié.

Lapin 11. — Mêmes détails de l'expérience.

Nous laissons ce lapin sans lui prendre d'urine pendant la vie. A la mort,

survenue 36 heures après l'inoculation, nous ponctionnons la vessie et la vésicule biliaire avec les mêmes précautions que dans les expériences précédentes : les tubesensemencés avec l'urine renferment de très nombreuses colonies de charbon. Les deux tubesensemencés avec la bile restent stériles.

Avec le charbon, qui donne des lésions dans les reins, on obtient donc, environ vers la 24^e heure, des cultures avec l'urine, tandis que la bile est stérile. Toutes nos expériences faites avec le charbon nous ont donné ces mêmes résultats.

Enfin les expériences faites dans les mêmes conditions que précédemment avec le bacille typhique, le *b. prodigiosus*, le pyocyanique ont été suivies des mêmes conclusions : stérilité de l'urine et de la bile dans les tubes d'ensemencement.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons choisi le cobaye et la voie sous-cutanée. Nous injectons des émulsions de cultures sur gélose en eau physiologique, et nous avons observé chaque fois la stérilité de l'urine et de la bile, lorsqu'il n'y avait pas de sang dans le liquideensemencé.

De ces expériences, il est permis de conclure :

1^o Les reins et le foie sont imperméables aux bactéries introduites dans l'organisme soit par la voie sous cutanée, soit par la voie intraveineuse ;

2^o Lorsque les tubes d'ensemencement contiennent des colonies du microbe injecté, c'est qu'il y a eu dans le liquideensemencé une certaine quantité de sang, indice d'une lésion vasculaire ou épithéliale, mécanique ou chimique.

SUR LA PROTÉASE DE L'ASPERGILLUS NIGER

PAR LE D^r G. MALFITANO

DEUXIÈME MÉMOIRE

Travail du laboratoire de M. Duclaux.

Dans un travail précédent ¹, j'ai étudié, dans ses rapports avec la cellule qui la produit, une diastase dont je voudrais étudier aujourd'hui les conditions d'action en dehors de la cellule. Pour simplifier, je l'appellerai protéase, parce qu'elle s'attaque aux matières protéiques. Ces matières ne sont pas encore assez bien spécifiées pour qu'on puisse spécialiser leurs diastases, comme on a commencé à le faire pour les sucres. Il vaut donc mieux, jusqu'à plus ample informé, conserver le nom de protéase. Une étude approfondie des conditions de température et de milieu qu'elle préfère ou dont elle souffre nous dira si elle est une ou multiple. Appliquons-lui donc les méthodes qui, jusqu'ici, se sont montrées les plus efficaces pour l'étude des autres diastases.

M. Fernbach, dans son étude de l'influence de la réaction sur l'amylase du malt, a introduit sur ce sujet une précision remarquable en tenant compte de l'état des phosphates du milieu, et j'ai fait bénéficier toutes mes recherches sur la protéase de cette indication précieuse.

Je chercherai ensuite à définir l'action de la protéase par la nature des substances attaquées et des produits élaborés. Enfin j'aborderai la comparaison de cette diastase avec les autres, mieux connues, comme la pepsine, la pancréatine et la papaïne.

I

PRÉPARATION ET ÉTUDE DES SOLUTIONS DE PROTÉASE

Une méthode avantageuse et rapide pour se procurer des préparations actives des diastases de l'*A. niger*, consiste à faire

1. Ces *Annales*, t. XIV, p. 60.

macérer du mycélium sec et finement moulu, et à en exprimer le liquide, qui, après filtration, est précipité par l'alcool.

On peut opérer en tout comme pour la préparation de l'amylase du malt.

Pour la diastase protéolytique, il est préférable de s'adresser à du mycélium récolté au moment de la sporulation, et rapidement séché à l'étuve à 35°.

L'expérience suivante peut donner une idée de la quantité de diastase que l'on peut retirer du mycélium récolté aux divers âges de la culture.

EXPÉRIENCE I. — On prend quatre échantillons de mycélium sec, provenant de cultures interrompues à des âges différents. On les réduit en poudre très fine, et on en détermine l'humidité et les cendres. On prélève alors de chacun exactement 40 grammes, qu'on met à macérer dans 100 c. c. d'eau chloroformée.

Après 6 heures, on exprime le liquide de macération au moyen d'un linge et on le filtre sur papier.

Dans les quatre solutions obtenues, on détermine la teneur en substances fixes et le pouvoir protéolytique.

Voici les résultats : L'acidité est mesurée avec la phénolphthaléine, et évaluée en c. c. d'une solution décimale de soude pour 100 c. c. Les temps nécessaires à la liquéfaction de la gélatine dans les conditions indiquées au mémoire précédent sont évaluées en heures et représentées par la lettre T.

EXAMEN DU MYCÉLIUM RÉCOLTÉ A L'ÂGE DE

	I 24 heures.	II 48 heures.	III 72 heures.	IV 240 heures.
Aspect.	Poudre blanc-jaunâtre.	Blanche.	Grise.	Noire.
Humidité 0/0	5,2	3,4	4,6	5,0
Cendres 0/0	5,5	4,3	2,9	7,2

EXAMEN DES LIQUIDES DE MACÉRATION OBTENUS

	I	II	III	IV
Acidité	2,9	0,95	1,05	2,5
Matières fixes	4,360	2,840	2,800	2,47
Cendres 0/0	0,479	0,224	0,230	0,375
T par 10 cc.	12	6	6	73
T — 8 —	12	12	6	—
T — 6 —	24	12	12	—
T — 4 —	36	18	12	—
T — 2 —	48	24	18	—

Cette expérience confirme les résultats déjà acquis sur la distribution de la diastase dans le mycélium de divers âges. Elle montre aussi qu'on peut obtenir facilement des solutions de

protéase suffisamment actives, bien que chargées encore de beaucoup de matières inertes.

Pour les en débarrasser le mieux possible, je me suis arrêté à la précipitation par l'alcool.

J'ai réussi par ce moyen à obtenir un produit très actif et dépourvu de matières inertes jusqu'à une certaine limite, qui apparaît alors dans l'expérience. J'ai voulu en même temps me renseigner sur la composition de ce liquide diastasifère.

EXPÉRIENCE II. — On a soumis à la précipitation fractionnée par l'alcool 500 c. c. de liquide de macération filtré, et on a obtenu ainsi les produits de trois précipitations successives, sous forme d'un résidu brun dans la première, presque blanc dans la troisième, et qui était collé sur le papier à filtrer.

On a alors épuisé ces trois filtres séparément avec la même quantité d'eau, et on a examiné de la façon suivante les trois solutions obtenues :

EXAMEN DES SOLUTIONS DES TROIS PRÉCIPITÉS

	I	II	III
Matières fixes 0/0	0 ^{sr} ,763	3 ^{sr} ,213	1 ^{sr} ,730
Cendres —	0,010	0,401	0,160
Réaction xanthoprotéique	faible	sensible	franche
— du biuret	négative	incertaine	franche
— de Fehling direct.	—	négative	négative
— de Fehling après			
ébullition en prés. d'acide.	positive	pas caractéristique	négative
T pour 10 c. c.	96	3	3
T — 5 —	240	6	3

On voit, par les chiffres ci-dessus, que les dernières portions du précipité par l'alcool contiennent la matière active dans un état relativement plus pur. D'autre part on remarque qu'on ne réussit pas à diminuer la quantité des cendres au delà de 10 0/0 des matières pesées.

Au point de vue de la nature des substances qui constituent ou accompagnent la diastase, j'ai eu des réactions tout à fait franches qui indiquent la présence de la peptone.

La réaction du biuret n'apparaît dans le liquide diastasifère qu'après une purification préalable, mais elle accompagne constamment la diastase.

Ces faits connus, je me suis préparé une provision de protéase constituée par des morceaux de papier à filtre, qui portaient un résidu facilement soluble dans l'eau et donnant des solutions actives : ce sont ces solutions qui ont servi au cours de cette étude.

II

 DES INFLUENCES QUI PEUVENT FAIRE VARIER L'ACTIVITÉ D'UNE SOLUTION
DE PROTÉASE

Comme on pouvait s'y attendre, ces solutions de protéase, mises à l'abri des microbes au moyen d'antiseptiques, perdent leur pouvoir protéolytique, et d'autant plus vite que la température est plus élevée. Une exposition de quelques heures à 70° leur enlève la faculté de liquéfier la gélatine.

Dans le vide, le pouvoir diastasique baisse presque aussi rapidement qu'en présence de l'air, mais en revanche il se conserve mieux si l'on remplace l'air par CO².

Ce fait pouvait tenir à la faible réaction acide qui est conférée au liquide par l'acide carbonique. En effet, il a été facile d'établir qu'en réaction acide le pouvoir protéolytique d'une solution de protéase se conserve mieux. J'ai donc cherché à fixer le degré de réaction acide auquel la destruction de la diastase est minima.

Ce degré optimum pour la conservation de la protéase en solution apparaît quand, dans le liquide diastasifère, tous les phosphates se trouvent à l'état monobasique. En présence d'acide libre d'une part, et de l'autre au fur à mesure que les basicités libres dans les monophosphates sont saturées, la diastase est détruite plus rapidement.

Voici les chiffres qui prouvent le fait avancé.

EXPÉRIENCE III. — Une solution de protéase est portée, avec quelques gouttes d'acide phosphorique, juste à la neutralité indiquée par le méthylorange, qui vire au rouge dans une liqueur quand tous les phosphates sont à l'état monobasique et que la première trace d'acide libre apparaît. On distribue ensuite cette solution dans des petits flacons à raison de 13 c. c. chacun, et on établit 7 échantillons.

Le 1 ^{er} reçoit	0 ^{cc} ,50	NaOH N/10	et	0 ^{cc} ,50	d'eau
Le 2 ^e	—	0,25	—	—	0,75 —
Le 3 ^e	—	0,10	—	—	0,90 —
Le 4 ^e	—	0,00	—	—	1,00 —
Le 5 ^e	—	0,10	H ₃ PO ₄ N/10	—	0,90 —
Le 6 ^e	—	0,25	—	—	0,75 —
Le 7 ^e	—	0,50	—	—	0,50 —

Les flacons, bien bouchés après addition de quelques gouttes de chloroforme, sont portés à l'étuve à 40°. Après 24 heures on les retire, et à chaque essai qui avait reçu de l'alcali on ajoute la quantité correspondante d'acide, et inversement de l'alcali à ceux qui avaient reçu de l'acide, enfin avec de

l'eau on porte dans tous les flacons le liquide au volume de 18 c. c. Ainsi tous les essais se trouvent dans les mêmes conditions de réaction et de concentration : on détermine alors le pouvoir protéolytique.

Essai	1	2	3	4	5	6	7
T pour 9 ^{cc}	—	24	36	18	18	48	48
— 6 ^{cc}	—	72	36	18	18	48	72
— 3 ^{cc}	—	102	48	24	36	72	96

Des 7 mélanges, dont le pouvoir protéolytique était originairement le même, c'est le n° 4 qui se montre le plus actif : c'est celui qui a subi l'action de la température de 40° en étant à la réaction neutre au méthylorange.

On voit encore que la réaction alcaline est plus nuisible à la conservation de notre diastase que la réaction acide correspondante.

Ce fait est intéressant : on verra dans la suite que c'est aussi au voisinage de la réaction acide des monophosphates que la diastase est plus active. Et il est vraisemblable que ces deux phénomènes sont liés d'un rapport étroit.

III

ÉTUDE SPÉCIALE DE L'ACTION DE LA PROTÉASE

J'ai étudié l'action de la protéase sur les trois substances protéiques principales : la gélatine, les albumines, la caséine. Pour chacune d'elles j'ai fait la recherche des produits de la digestion et j'ai déterminé la condition de réaction la plus favorable.

Les essais ont été toujours opérés en double, ils portaient sur des mélanges de ces substances avec la solution de protéase activé dans un cas, et chauffée au préalable dans l'autre.

1° *Action sur la gélatine.* — Jusqu'à présent j'ai presque uniquement pris pour guide dans mes recherches le phénomène de liquéfaction de la gélatine ; le moment est venu de se demander s'il est dû véritablement à un processus de digestion.

Tous les auteurs qui ont étudié l'action des ferments digestifs, des acides ou des alcalis, ou simplement de la chaleur sur les solutions de gélatine, ont observé que celles-ci perdent la propriété de se solidifier ; elles contiennent alors divers produits qui peuvent être différenciés par leur degré de solubilité dans les solutions salines, et qu'on sépare les uns des autres par une saturation fractionnée de la liqueur au moyen de sels neutres.

On est convenu de grouper ces termes successifs en trois types essentiels : proto et deutérogélatose, et peptone.

Dans les solutions de gélatine liquéfiées par action de la protéase, il m'a été facile de séparer l'une après l'autre : la protogélatose, par saturation avec NaCl; la deutérogélatose, qui se précipite dans le liquide débarrassé de la protogélatose, quand on le sature avec du sulfate d'ammoniaque; la peptone enfin, qui reste dissoute dans le liquide saturé à chaud de sulfate d'ammoniaque, et qu'on met en évidence au moyen de la réaction du biuret.

Pour rechercher les produits plus simples que la peptone, j'ai employé la précipitation par l'acide phosphotungstique, et j'ai pu constater que l'action de la protéase amène une augmentation de l'azote non précipitable par ce réactif. On pourrait conclure que l'action de cette diastase ne s'arrête pas à la formation de peptone, mais qu'elle se poursuit jusqu'à des produits de décomposition plus avancée tels que les amides.

Neumeister ¹ nie la formation de corps amidés dans la digestion même pancréatique de la gélatine; le même auteur d'ailleurs met en garde ² contre les résultats fournis par la précipitation au moyen de l'acide phosphotungstique. En effet, en suivant ses indications, j'ai pu vérifier que la peptone de gélatine ne se laisse jamais précipiter complètement ni par l'acide phosphotungstique, ni par les autres réactifs proposés. Dans ces conditions on ne peut tirer aucune conclusion, et je compte revenir sur cette question avec une technique plus sûre.

Mes expériences me permettent pourtant d'affirmer que la liquéfaction de la gélatine par la protéase traduit la transformation de cet albuminoïde en produits de plus en plus solubles et qui n'ont pas la propriété de gélatiniser.

*
* *

L'action de la protéase sur la gélatine exige une réaction faiblement acide, elle est arrêtée par la réaction alcaline. Or les acides et les alcalis sont à eux seuls capables de liquéfier la gélatine. Dans les expériences précédentes, l'action de l'acidité

1. NEUMEISTER. *Lehrbuch der physiol. Chemie*, I Eh., p. 204.

2. NEUMEISTER. *Zeitschr. f. Biologie*, N. F. Bd. VIII, p. 340.

seule était négligeable, mais à présent je devais établir par des essais plus délicats quelle est, dans la digestion de la gélatine, la part due à l'action de l'acide et celle due à l'action diastasique.

Je n'ai pas limité l'examen au phénomène de liquéfaction, mais j'ai procédé à la détermination quantitative de la gélatine digérée. Dans ce but j'ai employé la méthode de Beckmann¹, qui consiste à insolubiliser les albuminoïdes non digérés en portant à sec le liquide qui les contient après avoir ajouté de l'aldéhyde formique; on les sépare ainsi des produits de la digestion.

J'ai vu d'abord que l'aldéhyde insolubilise non seulement les albuminoïdes inaltérés, mais aussi les premiers termes de la digestion, jusqu'à la protoalbumose. Toutefois cette action s'arrête toujours au même point, et n'est pas sensiblement influencée par des faibles variations dans la réaction du liquide. L'emploi de la formaldéhyde présente encore l'avantage d'arrêter l'action diastasique, et je m'en suis servi de la façon suivante :

Le mélange à essayer, d'un volume de 25 c. c. au plus, et contenant entre 0,5 et 0,2 de gélatine, est neutralisé s'il le faut, et additionné de 2 c. c. de solution de formaldéhyde à 40 0/0. Le tout est alors laissé 8 à 10 heures dans une étuve à 105°. On épuise ensuite le résidu sec à l'eau bouillante à plusieurs reprises, en laissant macérer un certain temps, et on filtre à travers du papier Berzélius. On emploie en tout 500 c. c. d'eau. Les produits insolubilisés forment des pellicules, qui gonflent dans l'eau bouillante sans se dissoudre, et qui restent en partie collées au fond du petit ballon, et en partie tombent sur le filtre. Quand les lavages sont finis, on remet dans le ballon tous les produits insolubilisés en y introduisant le filtre, et le tout sert au dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl.

Pour étudier l'action sur la gélatine de la diastase à des différents degrés d'acidité, et parallèlement celle de l'acidité seule, j'ai opéré de la façon suivante :

EXPÉRIENCE I. — On a distribué dans des petits ballons de Bohême, par fractions de 25 c. c., une solution de gélatine à 2,5 0/0 additionnée de 0,2 0/0 de thymol. Dans une série de ces ballons, on a mélangé des quantités égales de diastase active, et dans une autre série de la même solution chauffée au préalable pendant un quart d'heure à 100°.

Ensuite on a ajouté parallèlement dans les deux séries des proportions croissantes d'acide oxalique, et amené tous les essais au même volume avec de l'eau distillée.

Les mélanges ainsi préparés ont été portés à l'étuve à 35°, et après diges-

1. BECKMANN. *Zeitschrift f. analyt. Chemie*, XXXVI, Bd., p. 727.

tion on les a retirés pour doser l'azote de la gélatine non digérée, selon la méthode décrite.

Le tableau suivant renferme les proportions employées pour composer les mélanges et les résultats obtenus après la digestion :

Acide ajouté sur 25 c.c. de solution de gélatine en c.c. Ac. Oxalique N.		GÉLATINE NON DIGÉRÉE, EN MILLIGRAMMES D'AZOTE			
		I. Digestion.		II. Digestion.	
		Durée 12 heures.		Durée 48 heures.	
		Protéase active	Protéase chauffée	Protéase active	Protéase chauffée
1.	0 ^{cc} ,0	35,0	63,0	0,0	56,0
2.	1,0	43,4	62,3	0,0	49,0
3.	2,5	58,8	62,3	6,2	45,5
4.	5,0	62,3	62,3	17,6	44,1
5.	10,0	63,0	62,3	25,2	44,8
6.	20,0	63,0	62,3	21,0	19,6
7.	25,0	62,3	60,2	15,4	6,1

Les chiffres ci-dessus nous apprennent que l'action de la diastase et celle de l'acidité dans la digestion de la gélatine se superposent. En même temps des doses croissantes d'acide gênent l'action de la diastase. La contradiction n'est qu'apparente. En effet, dans l'expérience que nous venons d'exposer, on peut bien dégager l'action de la diastase de celle de l'acidité seule. On voit, dans la série où la diastase agit en présence de doses croissantes d'acide, que l'activité de la digestion diminue d'abord et après augmente de nouveau. Dans la série où, toutes choses égales d'ailleurs, la diastase a été rendue inactive, la digestion augmente d'intensité avec la quantité d'acide. Les deux courbes doivent se rencontrer et marcher ensemble; à partir de ce moment évidemment la diastase ne doit plus entrer en jeu, et dans les deux séries c'est seulement l'acidité qui agit.

Il restait encore à rechercher quelle est la réaction optimale pour l'activité de notre diastase.

Dans l'expérience précédente, on a indiqué seulement la quantité d'acide oxalique ajoutée; or les conditions de réaction d'un liquide pareil dépendent non seulement de la quantité d'acide ajoutée, mais encore plus de la teneur et de la qualité des phosphates présents. On sait qu'on ne doit pas s'éloigner de la neutralité pour rechercher la réaction optimale, et dans ces conditions on est censé avoir affaire à des phosphates acides plutôt qu'à de l'acide libre. — On peut tirer profit dans ce cas de l'emploi des différents indicateurs pour composer des mélanges

dont les réactions sont échelonnées, de l'alcalinité par une trace d'alcali libre à l'acidité par acide libre, en passant à travers tous les états des phosphates.

EXPÉRIENCE II. — On a préparé deux mélanges en tout comparables de gélatine à 5 0/0 thymolisée, avec une solution de protéase, active dans un cas, et chauffée au préalable dans l'autre. Ces deux mélanges sont portés juste à la neutralité au méthylorange au moyen de quelques gouttes d'acide phosphorique. On les distribue ensuite dans des flacons à raison de 100 c. c. chacun, et on en fait deux séries d'essais auxquels on ajoute les quantités d'acide et d'alcali indiquées plus bas. Après un séjour de 24 heures à la température de 35°, on a retiré de chaque flacon des portions de 10 c. c. qui, après avoir été neutralisées, ont servi au dosage de l'azote de la gélatine non digérée.

Les mélanges ont reçu :

	H ₃ PO ₄ N	H ₂ O	Azote de la gélatine non digérée par la protéase active	par la protéase chauffée
	—	—	—	—
1.	6 ^{cc} ,0	4 ^{cc} ,0	67 ^{mgr} ,2	63 ^{mgr} ,7
2.	4,0	4,0	44,8	67,2
3.	2,0	8,0	42,0	70,7
4.	0,0	10,0	39,2	71,4
	NaOH N			
5.	2,0	8,0	51,1	74,2
6.	4,0	6,0	73,5	72,8
7.	6,0	4,0	72,8	63,0
8.	8,0	2,0	21,0	20,3
9.	10,0	0,0	00,0	00,0

On voit d'une façon vraiment évidente que le maximum d'activité de la diastase a lieu dans le mélange n° 4 qui est justement celui où la réaction est restée à la neutralité du méthylorange, qui ne contient donc pas d'acide libre : on sait au contraire qu'il contient des phosphates monobasiques. Une nouvelle quantité d'acide ajoutée à la liqueur reste à l'état libre et gêne l'action de la diastase, qui d'autre part est arrêtée bien vite quand on sature par la soude les basicités libres des monophosphates.

2° *Action sur les albumines.* — La digestion des albumines par le mélange de diastases de l'*Aspergillus niger* est moins facilement saisissable que celle de la gélatine.

L'albumine coagulée par la chaleur, quelle qu'elle soit, n'est jamais dissoute. Même en agissant avec des solutions très acti-

ves sur la gélatine, on ne voit attaquer ni l'albumine d'œuf des tubes de Mette, ni la fibrine cuite.

L'albumine d'œuf en solution est aussi très résistante. Les différences relevées entre deux liquides, également acides ou alcalins, additionnés les uns de protéase, les autres de la même protéase chauffée à 100°, ne présentent que des différences peu appréciables qu'il serait trop long de décrire, je reviendrai du reste sur ce point dans un des chapitres suivants.

Je veux cependant attirer l'attention sur les phénomènes de coagulation, qui ont lieu dans les mélanges albuminoïdes sans l'intervention de la diastase. L'albumine dont la réaction est voisine de la neutralité au tournesol se coagule toujours, rapidement si l'on chauffe, plus lentement mais aussi bien à la température ordinaire. Elle se transforme ainsi en un produit qui n'est dissous que par des solutions concentrées d'acide ou d'alcali, ou mieux par l'action de la pepsine, mais jamais par la diastase de l'*Aspergillus*.

Bien plus sensible est l'action digestive sur la fibrine. Il faut cependant se mettre dans des conditions favorables, qui consistent surtout dans la nécessité d'opérer avec des solutions de diastase très active et en même temps pas trop dense. La présence des matières inertes qui accompagnent la diastase en empêche l'action. J'ai évité cette difficulté en opérant de la façon suivante.

A deux volumes égaux de la même solution de protéase, dont l'une avait été chauffée à 100° au préalable, on ajoute des flocons de fibrine de porc fraîche essorée; on laisse en contact pendant quelques heures à une température inférieure à 10° en agitant de temps en temps, et ensuite on retire la fibrine, on l'exprime et on distribue les flocons dans des vases qui contiennent de l'eau distillée chloroformée, ou des solutions N/100, N/50, N/25 d'acide phosphorique ou de soude caustique. Après quelques heures de séjour à l'étuve à 45°, on voit déjà complètement dissoute la fibrine qui avait été en contact avec la solution diastasique active et plongée ensuite dans la solution N/100 acide; dans l'essai témoin la fibrine était simplement gonflée. A la neutralité la fibrine s'émiette sans jamais se dissoudre complètement: dans la solution alcaline N/100 il n'y a pas de différence entre l'essai et son témoin. Avec le temps et en présence de doses plus considérables d'acide et d'alcali, la dissolution de la fibrine se fait partout, sauf à la neutralité, et, pour révéler les différences dues à l'action de la diastase, j'ai eu recours à des réactions comme celles par l'acide nitrique, ou par précipitation avec les sels neutres.

Mais l'étude de l'action d'une diastase digestive relativement faible, et qui agit surtout au voisinage de la neutralité, n'est pas aisée à poursuivre sur la fibrine, car cette substance subit une digestion spontanée, qui est probablement due à des diastases qu'elle emporte du sang, et dont les effets couvrent ceux de l'action à étudier. J'ai mieux réussi en m'adressant à l'albumine du sérum sanguin.

Voici dans quelles conditions j'ai mis en évidence la digestion et les conditions de réaction optima :

On a préparé des mélanges de sérum de sang de bœuf dilué au dixième, et chauffé pour détruire les diastases qu'il contient déjà, avec des solutions de diastase chauffée dans un cas et active dans l'autre. On a disposé deux séries parallèles d'essais dont les termes possédaient des réactions qui s'échelonnaient de l'alcalinité à la phénolphtaléine à l'acidité au méthylorange.

De ces mélanges, on prélevait, aussitôt après la préparation, des essais sur lesquels on dosait l'albumine coagulable. D'autres essais étaient prélevés après un séjour de 48 heures à 45°. Dans le tableau suivant sont rangés les chiffres qui représentent en miligrammes d'azote l'albumine insolubilisable avant et après digestion. Chaque essai porte à côté l'indication de la réaction.

Réaction	Mélanges avec la diastase			
	chauffée		active	
	avant	après	avant	après
1. Acide au méthylorange	85 ^{mgr} ,4	76 ^{mgr} ,3	84 ^{mgr} ,7	49 ^{mgr} ,0
2. Neutre —	85,4	79,1	83,3	39,2
3. Acide au tournesol	85,1	74,2	85,4	63,5
4. Neutre —	86,1	70,0	85,4	78,8
5. Alcalin —	84,7	82,6	84,0	70,7
6. Neutre à la phénolphtaléine	84,7	61,4	84,7	78,4
7. Alcalin —	84,0	68,5	84,7	68,6

Il résulte de cette expérience que l'activité de la protéase sur l'albumine du sérum est bien manifeste, et qu'elle est bien plus prononcée à la réaction des phosphates acides. Le n° 4 seul présentait une coagulation, qui était égale dans l'essai et dans le témoin, et dans ces conditions, l'action de la diastase était nulle. Je reviendrai dans le chapitre suivant sur les différences entre l'action de la protéase sur l'albumine d'œuf et sur celle du sérum; à présent je dirai seulement que cette dernière paraît plus facilement transformable en alcali-albumine ou acide-albumine sans donner lieu à coagulation, et que c'est jus-

tement sur cette transformation de l'albumine que l'action de notre diastase paraît se porter.

Dans les mélanges n° 3, où la digestion par la protéase avait été plus active, j'ai recherché comparativement les produits formés; j'y ai trouvé, en suivant la marche indiquée dans l'étude de la gélatine, les produits successifs de la dégradation de l'albumine jusqu'à la peptone. Cependant j'ai toujours remarqué que la quantité des produits premiers de la digestion, tels que les albumoses et la peptone, était toujours très petite vis-à-vis de l'albumine disparue.

Il est probable que la diastase de l'*aspergillus* pousse de suite la digestion de l'albumine aux produits plus simples que la peptone, que je n'ai pas encore recherchés;

3° *Action sur la caséine.* — Si l'on ajoute à du lait normal une solution de protéase bien active, et si l'on porte le mélange additionné d'un antiseptique à l'étuve à 45°, on voit bientôt se former un coagulum qui se contracte lentement sans former dépôt au fond du vase, et qui n'est pas dû à un changement dans la réaction. Il y a donc de la présure dans la préparation diastatique. Ensuite ce coagulum diminue de plus en plus de volume, il semble se redissoudre, mais il ne disparaît jamais complètement, même après un très long temps. Le liquide devient jaune miel, et donne les réactions des albumoses et de la peptone.

L'action de la protéase sur le lait ressemble donc en tout à celle de la caséase étudiée par M. Duclaux.

Afin d'éviter la complexité due à la superposition de la coagulation par la présure et de la digestion par la diastase protéolytique, j'ai essayé la digestion des solutions artificielles de caséine.

EXPÉRIENCE I. — Une solution à 3 0/0 de caséine dans l'eau de chaux, neutralisée et additionnée de protéase, est portée à l'étuve à 35°.

On voit après quelques heures la masse du liquide opaque, mais homogène, se troubler davantage, et se séparer ensuite en deux portions; une couche inférieure formée par un dépôt floconneux, et le liquide qui surnage, qui devient de plus en plus transparent.

Le dépôt, d'aspect floconneux d'abord, devient pulvérulent plus tard et, par les réactions qu'il donne, paraît correspondre à celui qui a été observé dans la digestion de la caséine au moyen du suc gastrique, et que l'on considère comme constitué par des nucléines non digestibles.

Le liquide se colore de plus de plus, et, dans les prélèvements faits après une digestion de quelques jours, il donne les réactions des albumines et de la peptone, tandis que, dans une digestion prolongée pendant un mois, le liquide séparé du résidu insoluble ne montre plus que la réaction xantho-protéique. J'ai opéré une précipitation fractionnée par l'alcool des substances dissoutes dans ce liquide, afin de voir si les substances albuminoïdes étaient vraiment disparues, ou si les réactions qui les décèlent étaient seulement empêchées. Mais aucune des portions obtenues ne donnait la réaction du biuret.

Il paraît donc que la digestion ne s'arrête pas à la formation de peptone.

Je me suis alors appliqué à établir les conditions de réaction les plus favorables à la digestion de la caséine par la protéase. Et dans ce but j'ai opéré d'après les mêmes règles que dans les expériences précédentes.

EXPÉRIENCE II. — Chaque essai contenait 25 c. c. d'une solution de caséine à 2,5 0/0 dans l'eau de chaux, et qui avait été rendue neutre à la phénolphthaléine. On y avait ajouté 5 c. c. de liquide diastasifère, et des quantités croissantes d'acide phosphorique jusqu'à dépasser de peu le moment de la précipitation de la caséine. C'est au n° 7 que la précipitation commence.

Tous les essais sont ramenés au même volume avec de l'eau distillée.

Après une digestion de 48 heures à l'étuve à 35°, on a acidifié également tous les essais, qui étaient contenus dans des ballons de Bohême, et on a ajouté 2,0 c. c. de solution de formaldéhyde pour procéder au dosage de l'azote dans le résidu non digéré.

N°s	Acide phosph. N. ajouté	Azote insolubilisable après digestion en présence de diastase	
		active	chauffée à 100°
1.	0 ^{cc} ,00	52 ^{mgr} ,5	88 ^{mgr} ,2
2.	0,10	51,8	88,2
3.	0,25	54,6	88,9
4.	0,50	51,1	87,5
5.	1,00	39,2	87,5
6.	1,50	30,1	86,8
7.	2,00	26,6	78,4
8.	2,50	35,0	88,2
9.	3,00	39,8	88,2

EXPÉRIENCE III. — Cette deuxième expérience a été conduite dans les mêmes conditions que la précédente, seulement on s'est servi d'une solution de caséine dans l'ammoniaque, et les doses d'acide phosphorique nécessaires à amener la précipitation ont été un peu plus grandes. C'est aussi l'essai n° 7 qui se trouve à la limite du commencement de précipitation.

N ^{os}	Acide phosph. N. ajouté	Azote insolubilisable après digestion en présence de diastase	
		active	chauffée à 100°
1.	0 ^{oo} ,00	47 ^{mgr} ,6	56 ^{mgr} ,5
2.	0,10	53,9	78,4
3.	0,25	46,9	80,5
4.	0,50	39,2	91,0
5.	1,00	30,8	83,3
6.	2,00	28,0	63,0
7.	3,00	21,7	63,0
8.	4,00	25,2	63,0
9.	5,00	32,9	58,8

De ces chiffres on peut conclure que la digestion de la caséine par la protéase est bien active : elle est favorisée par une faible réaction acide. Le maximum d'action se place au maximum d'acidité qu'une solution de caséine peut atteindre avant de commencer à précipiter.

IV

ÉTUDES COMPARATIVES DE LA PROTÉASE AVEC D'AUTRES DIASTASES PROTÉOLYTIQUES

Après l'étude spéciale que je viens d'exposer, les caractères principaux de la protéase sont suffisamment établis pour en déduire les relations de parenté et les dissemblances qui existent entre celle-ci et les autres diastases digestives des albuminoïdes. Cependant, pour assigner à la diastase en question une place déterminée parmi les autres, j'ai trouvé nécessaire de poursuivre des recherches comparatives portant à la fois sur l'action de la protéase et sur celle de la pepsine, de la pancréatine et de la papaïne, et cela dans des conditions permettant le mieux d'obtenir des résultats suffisamment comparables.

Tout d'abord, il fallait rechercher dans quel sens et dans quelle mesure ces différentes diastases sont influencées par les variations de la réaction du milieu où elles agissent.

Je me suis servi des préparations commerciales de ces trois diastases, et j'en ai étudié l'action comparativement avec mes préparations de protéase. Des digestions de gélatine, de fibrine et de caséine ont été mises en train avec ces quatre diastases, et pour chacune d'elles on a fait plusieurs essais, où, toutes choses étant égales d'ailleurs, la réaction du milieu variait de

l'acidité par acide libre à l'alcalinité par des phosphates tribasiques. Pour obtenir des résultats concluants, il a fallu d'abord connaître le pouvoir protéolytique de chacune des préparations employées, et les limites de réaction entre lesquelles elles sont actives. Il est nécessaire d'opérer avec des quantités de ces diastases, telles que l'action soit ni trop rapide ni trop lente : dans le premier cas l'influence de la réaction est difficile à saisir, dans le deuxième on ne saurait bien définir si les modifications observées sont dues à l'action de la diastase ou à celle de la réaction.

EXPÉRIENCE I. — *Digestion comparée de la gélatine.* — Chaque tube, contenant 5 c. c. de gélatine à 20 0/0 et thymolisée, reçoit 5 c. c. de solutions des différentes diastases, et la dose d'acide ou d'alcali nécessaire pour l'amener à la réaction indiquée plus bas. Tous les tubes sont ensuite ramenés, au moyen d'eau distillée, au même volume, et sont portés à l'étuve à 35°.

Dans le tableau suivant, on a indiqué, dans la case correspondant à chaque essai, le nombre d'heures nécessaires à la liquéfaction de la gélatine.

	Protase	Pepsine	Pancréatine	Papaine	Temoins
I. Acide au méthylorange contient 5 cc. H_3PO_4 /X litre	36	12	—	—	—
II. — — — 2,5 —	24	6	—	24	—
III. — — — 1,0 —	24	6	72	24	—
IV. Neutre — — des monophosphates	9	6	48	12	—
V. Acide au tournesol contient un mél de mono et biphosphate.	12	24	24	3	—
VI. Neutre — — — — —	48	—	3	3	—
VII. Alcalin — — — — —	—	—	3	12	—
VIII. Neutre à la phénolphthaline contient des biphosphates.	—	—	3	24	—
IX. Alcalin — — — triphosphates.	48	48	3	48	48

EXPÉRIENCE II. — *Digestion comparée de la fibrine.* — On place des boulettes de fibrine de porc fraîche essorée et finement hachée, toutes à peu près du poids de 0,5 grammes, dans des éprouvettes larges et basses, et on y verse la même quantité de solution diastasique qu'on avait employée pour la gélatine, et les doses d'acide ou d'alcali indiquées dans le tableau : le volume du mélange est porté dans tous les essais à 50 c. c.

Dans la case correspondante à chaque mélange on a indiqué l'état de la fibrine après un séjour de 5 heures à l'étuve à 35°.

Le n° 1 indique que la fibrine est seulement gonflée, les n°s 2 et 3 qu'elle a subi une dissolution plus ou moins avancée, le signe + indique la dissolution complète, enfin avec le signe — on indique que la fibrine n'a pas changé d'aspect.

	1 Ac. phosph. N c.c. 3,0	2 Ac. phosph. N c.c. 2,5	3 Ac. phosph. N c.c. 1,0	4 Ac. phosph. N c.c. 0,5	5 Rien.	6 Soude N c.c. 0,5	7 Soude N c.c. 1,0	8 Soude N c.c. 2,5	9 Soude N c.c. 5,0
Protéase	3	3	+	+	—	—	1	2	3
Pepsine	+	+	+	+	—	—	1	2	3
Pancréatine	1	1	1	1	3	3	+	+	+
Papaïne	1	1	1	2	3	2	1	2	3
Témoins	1	1	1	—	—	—	2	3	3

EXPÉRIENCE III. — *Digestion comparée de la caséine.* — Des tubes contenant chacun 5 c. c. de lait dégraissé et additionné de 2 0/00 d'acide phénique, reçoivent 5 c. c. de solution diastasique et les doses d'acide ou d'alcali indiquées au tableau, ensuite la quantité d'eau phéniquée nécessaire pour amener le mélange à 15 c. c. Après 12 heures d'étuve à 35°, les tubes sont retirés et agités fortement.

Dans la case correspondante à chaque mélange, on a indiqué par les chiffres 1, 2, 3, le degré de solubilisation de la caséine, comme on peut l'apprécier par la diminution de l'opacité du mélange.

	1 Ac. phosph. N c.c. 5	2 Ac. phosph. N c.c. 2,5	3 Ac. phosph. N c.c. 1,0	4 Ac. phosph. N c.c. 0,5	5 Rien.	6 Soude N c.c. 0,5	7 Soude N c.c. 1,0	8 Soude N c.c. 2,5	9 Soude N c.c. 5,0
Protéase	2	2	2	3	3	2	2	2	3
Pepsine	2	2	1	1	1	0	1	2	3
Pancréatine	1	1	1	2	3	3	3	3	3
Papaïne	0	0	1	1	2	2	1	2	3
Témoins	0	0	0	0	0	0	1	2	3

Les résultats des expériences que je viens d'exposer confirment des points déjà établis, mais qu'il était intéressant de

vérifier en se plaçant dans des conditions parfaitement comparables : il en résulte que :

La protéase agit déjà en milieu neutre, et cela n'arrive pas pour la pepsine, mais bien pour la pancréatine et la papaïne.

La réaction acide est favorable à l'action de la protéase, mais dans une mesure plus limitée que pour la pepsine. La réaction alcaline arrête l'action de la protéase, et plus brusquement que cela n'arrive pour la papaïne.

Si l'on veut tenir compte de l'état des phosphates dans le mélange comme il nous est révélé par les indicateurs, on peut ranger ces quatre diastases dans l'ordre suivant :

La pepsine commence véritablement à agir dans les milieux qui font virer au rouge le méthylorange, et qui contiennent donc de l'acide libre.

La protéase agit le mieux à la réaction acide au tournesol et neutre encore au méthylorange, c'est-à-dire en présence de monophosphates.

La papaïne se comporte comme la protéase, seulement elle paraît plus sensible que la protéase à l'action nuisible de l'acide libre, et d'autre part, elle est moins gênée par la présence des bi-phosphates.

Enfin, la pancréatine agit entre la neutralité au tournesol et la neutralité à la phénolphthaline. Après cette limite, son action est couverte par celle de l'alcali seul.

J'ai vérifié que pour les autres diastases comme pour la protéase, la réaction optima d'action correspondait à celle où la destruction de la diastase en solution est la plus faible. En opérant comme je l'ai exposé ci-dessus pour la protéase, j'ai pu constater que c'est juste nent aux réactions sus-indiquées : à l'acidité au méthylorange pour la pepsine, à l'acidité au tournesol pour la papaïne, et à la neutralité à la phénolphthaline pour la pancréatine, que ces diastases gardent le mieux leur activité quand on les conserve en solution.

*
* *

Les expériences que je viens d'exposer nous montrent seulement en gros le phénomène de la digestion par ces quatre diastases. Il reste encore à rechercher comparativement les produits de ces digestions.

Dans ce but, et pour vérifier en même temps les résul-

tats des expériences précédentes, j'ai opéré sur des solutions de gélatine et d'albumine du sérum sanguin chauffé. J'ai préparé comme précédemment des mélanges de ces deux substances albuminoïdes et des solutions diastasiques, et je les ai amenées à des réactions différentes et bien définies, sans rien altérer dans les rapports de volume et de concentration.

De ces mélanges, on a prélevé des portions égales, une fois avant la digestion et une autre après un séjour de 24 heures à l'étuve à 45°. Sur ces portions on a dosé la quantité de gélatine et d'albumine non digérée par les méthodes déjà décrites. Les chiffres de l'azote qui suivent indiquent en milligrammes la quantité d'azote du résidu *insoluble* sur 100 c. c. de mélange, et permettent d'apprécier l'action de chaque diastase suivant les différentes réactions du milieu.

DIGESTION DE LA GÉLATINE PAR LA					
Azote dans le résidu insoluble avant.	Protéase.	Pepsine.	Pancréatine	Papaïne.	Témoins.
	0gr,3553	0gr,3528	0gr,3288	0gr,3524	0gr,3280
Après la digestion.					
1. Acide au méthylorange.	134 ^{mgr} ,3	228 ^{mgr} ,5	280 ^{mgr} ,0	282 ^{mgr} ,4	292 ^{mgr} ,2
2. — au tournesol.	0,0	248,5	281,9	147,0	288,7
3. Neutre —	0,0	304,0	252,5	28,0	258,3
4. Alcalin —	322,5	304,4	0,0	251,9	305,5
5. — à la phénolphthaline.	281,5	288,7	0,0	281,4	262,9

DIGESTION DE L'ALBUMINE PAR LA					
Azote dans le résidu insoluble avant.	Protéase.	Pepsine.	Pancréatine	Papaïne.	Témoins.
	0gr,3211	0gr,3250	0gr,3195	0gr,3200	0gr,3040
Après la digestion.					
1. Acide au méthylorange.	212 ^{mgr} ,8	14,1	310 ^{mgr} ,0	301 ^{mgr} ,5	305 ^{mgr} ,9
2. — au tournesol.	186,1	121,8	305,5	311,5	312,9
3. Neutre. —	147,7	292,5	252,0	242,5	297,5
4. Alcalin. —	275,0	308,0	129,5	212,5	277,5
5. — à la phénolphthaline.	35,0	38,2	74,2	85,1	35,0

Les conclusions déjà arrêtées se trouvent suffisamment confirmées par ces nouveaux résultats, qui sont plus précis sans être plus significatifs. En effet, l'intensité de la digestion ne peut pas être exprimée seulement par la disparition de la substance albuminoïde primitive, mais par le travail moléculaire accompli, qui dépend aussi de la nature des produits formés. J'ai alors repris ces mélanges après quelques semaines (pendant ce temps la digestion s'était achevée) pour les soumettre à une analyse systématique dans le but de rechercher les produits de la digestion jusqu'à la peptone. Pour cela j'ai suivi constamment la même marche et j'ai opéré sur des quantités égales et dans les mêmes conditions, afin de pouvoir comparer les résultats.

J'ai pu ainsi constater que le processus de dégradation de la molécule albuminoïde jusqu'à la peptone suit la même marche, quelle que soit la diastase ou même l'agent chimique, acide ou alcali, qui la détermine. Les différences consistent essentiellement non dans la qualité, mais dans les proportions des divers produits formés; j'ai toujours observé que l'acte de la digestion se révèle par des changements dans les caractères de solubilité de la matière albuminoïde. L'albumine subit d'abord des transformations qui ne paraissent pas réclamer l'intervention de la diastase. Si la réaction est près de la neutralité au tournesol, il y a une coagulation. Si la réaction est acide ou alcaline, l'albumine reste en solution, mais elle est transformée en produits insolubles dans les milieux neutres, et qui par conséquent précipitent par addition respectivement d'alcali ou d'acide.

L'action de la diastase entre en jeu pour former des produits de plus en plus solubles, et par suite plus difficilement précipitables par la saturation au moyen de sels neutres.

L'influence de la réaction se manifeste dès les premiers changements subis par la matière albuminoïde, et je pense qu'elle doit surtout déterminer l'action ultérieure qui se porte sur la peptone. Il serait intéressant de reprendre ces expériences pour étudier les produits plus simples que la peptone.

*
* *

Après avoir comparé la protéase avec les autres diastases

en rapport d'abord avec la réaction du milieu, ensuite avec les produits de leur digestion, il restait encore à étudier leur activité en rapport avec les diverses substances albuminoïdes.

Ce problème a été posé par Duclaux, qui est arrivé à se demander si chaque matière albuminoïde n'a pas sa diastase spécifique, tout au moins dans les limites où cela se vérifie pour les diastases des hydrates de carbone.

J'ai voulu étudier un côté de cette question bien complexe, celui qui consiste à comparer l'activité des quatre diastases sur les différentes substances albuminoïdes. Je me suis donc proposé de rechercher s'il y a, ou non, proportionnalité dans l'activité de ces préparations diastasiques vis-à-vis des différentes substances. Déjà au cours des expériences dont il a été question, et dans lesquelles j'avais fait agir dans le même temps et dans des conditions comparables la même quantité de chacune de ces diastases sur des échantillons égaux des différentes substances, j'avais pu remarquer que le pouvoir digestif des préparations employées n'était ni constant ni proportionnel, quand on les faisait agir sur des albuminoïdes différents.

Je me suis alors appliqué à préparer des solutions possédant au même degré le pouvoir de liquéfier la gélatine, pour les faire agir ensuite comparativement sur la fibrine. J'ai pu ainsi constater que la pepsine digère relativement mieux les albumines que la gélatine. Tandis qu'une solution de pepsine faiblement active sur la gélatine digère aussi très bien la fibrine et l'albumine cuite, j'ai pu avoir des solutions de pancréatine, de papaïne, et de protéase, encore capables de liquéfier la gélatine, mais inactives sur la fibrine.

C'étaient là les résultats d'une première série d'expériences, dont je négligerai de donner les détails. Mais bientôt j'eus à me préoccuper d'une cause d'erreur très grave : celle de l'influence des substances dissoutes dans les liquides employés.

Dans une expérience où je faisais agir des quantités décroissantes de diastases sur des quantités égales de fibrine, les essais étant portés au même volume avec de l'eau distillée, j'ai vu le maximum d'action se placer, non pas là où il y avait plus de diastase, mais dans les derniers termes de la série, où la quantité de diastase était plus petite et le milieu moins concentré. Dans ce cas l'observation portait sur une solution de

protéase, qui contenait 2^{gr},5 0/0 de matières fixes. Des essais parallèles, qui avaient reçu une solution de pepsine, ne montraient pas ce phénomène.

Les liquides diastasifères, qui étaient préparés de façon à avoir le même pouvoir liquéfiant sur la gélatine, n'avaient pas le même pouvoir dissolvant sur la fibrine : mais cela pouvait tenir, non pas à une différence spécifique des diastases, mais bien à la différence qualitative et quantitative des substances inertes dissoutes dans ces liquides.

Il apparaît donc nécessaire d'opérer avec des liquides diastasifères de même composition. Et dès lors les essais ont été répétés chaque fois en même temps avec la protéase et l'autre diastase à comparer avec elle. On procédait de la façon suivante.

On préparait des solutions des deux diastases, qui étaient douées du même pouvoir liquéfiant vis-à-vis de la gélatine. Ces solutions étaient partagées en deux portions, l'une était gardée telle quelle, l'autre chauffée à 70° pendant 2 heures. Ensuite on mélangeait à volumes égaux la solution de protéase active et et celle de l'autre chauffée, et inversement.

De ces deux liquides, qui ne différaient que par leur principe actif, on portait des quantités décroissantes sur des échantillons de gélatine et de fibrine : les dilutions étaient faites en ajoutant, au lieu d'eau distillée, un mélange en parties égales de ces deux solutions chauffées.

Je pense qu'il n'est pas possible d'approcher d'avantage de l'identité des conditions.

Il fallait encore tenir compte d'un coefficient de premier ordre, l'influence de la réaction. Cette influence est probablement différente pour la même diastase vis-à-vis des diverses substances. Et j'ai comparé la protéase et la pepsine à différents degrés d'acidité, en commençant par la neutralité au méthylorange ; mais, pour la comparaison avec la pancréatine et la papaïne, il fallait se borner à la réaction neutre au tournesol. Je ne me suis pas contenté de l'observation directe de la dissolution de la fibrine, mais j'ai recherché, par le chauffage en présence d'acide nitrique, le moment de la disparition complète de l'albumine coagulable.

EXPÉRIENCE. — On a préparé :

a) 200 c. c. solution de protéase contenant 2,5 0/0 matières fixes.

b) 200 c. c. solution pepsine contenant 4,7 0/0 matières fixes.

Ce sont là les proportions nécessaires pour obtenir des solutions dont l'action sur la gélatine soit comparable. De chacune de ces solutions, on garde 30 c. c. et l'on chauffe les 150 c. c. restants. Ensuite, on fait les mélanges suivants :

pr) 50 c. c. solution protéase active + 50 c. c. solution pepsine chauffée.

ps) 50 c. c. solution pepsine active + 50 c. c. solution protéase chauffée.

pp) 100 c. c. solution protéase chauffée + 100 c. c. solution pepsine chauffée.

Les deux mélanges actifs *pr* et *ps* sont distribués en quantités décroissantes dans des tubes de gélatine au thymol et dans des vases contenant des boulettes de fibrine. On se sert du mélange inactif *pp*, pour amener dans tous les essais les liquides au même volume. On s'est arrangé de façon à avoir trois séries d'essais, dont la première à la réaction neutre au méthylorange, la deuxième en présence d'acide phosphorique libre au titre N/100, et la troisième au titre N/50.

DIGESTION DE LA GÉLATINE

	Protéase			Pepsine		
	I	II	III	I	II	III
Le mélange est liquide par 10 ^{es} après heures						
— 8 — —	24	36	36	72	60	48
— 6 — —	48	48	48	—	66	48
— 4 — —	48	60	60	—	72	48
— 2 — —	66	66	66	—	84	66
— 2 — —	72	72	72	—	90	66

DIGESTION DE LA FIBRINE

Observation après 12 heures à l'étuve à 35°.

Bien que l'on puisse remarquer une graduation dans l'effet produit par des quantités décroissantes de diastase, les différences ne sont pas assez distinctes pour les représenter avec des chiffres.

Par la protéase	I ^e série. —	La fibrine est émietlée.
	II ^e —	La fibrine est dissoute et le liquide précipite faiblement par HNO ₃ à chaud.
	III ^e —	La fibrine est dissoute et le liquide précipite abondamment par l'HNO ₃ à chaud.
Par la pepsine	I ^e série. —	La fibrine est intacte.
	II ^e —	La fibrine est dissoute et le liquide ne précipite pas par HNO ₃ .
	III ^e —	La fibrine est dissoute et le liquide ne précipite pas par HNO ₃ .

Cette expérience montre que la solution de protéase, comparativement à celle de pepsine, est plus active sur la gélatine que sur la fibrine. — Maintenant qu'on a rendu les deux liquides diastasifères parfaitement comparables, la différence d'action,

quoique moins prononcée, apparaît bien saisissable, et on ne peut pas l'attribuer à des influences secondaires.

La comparaison de la protéase avec la pancréatine et la papaine a été faite à la neutralité au tournesol; elle n'est pas aisée, car dans ces conditions la fibrine s'émiette sans se gonfler, et ne se dissout jamais complètement. — En tout cas j'ai pu constater toujours que la diastase qui se montrait la plus active sur la gélatine, attaquait aussi plus vite la fibrine.

J'ai répété ces expériences avec l'albumine du sérum, et dans ce cas on peut évaluer l'activité de chaque mélange par la rapidité avec laquelle une coagulation a lieu dans le liquide albuminoïde. Dans ces conditions les résultats précédents étaient confirmés.

*
* *

De ces dernières expériences, où l'on a fait agir les quatre diastases sur deux albuminoïdes choisis parmi les plus différents, on a pu, seulement dans le cas de la comparaison de la protéase avec la pepsine, saisir une disproportion entre la digestion de la gélatine et celle de la fibrine. Mais c'est en opérant sur l'albumine d'œuf coagulée ou même en solution, qu'une différence bien accusée apparaît entre l'action de la protéase et de la papaine d'une part, et de la pepsine et de la pancréatine de l'autre.

EXPÉRIENCE. — On a fait agir des solutions des quatre diastases, préparées de façon à avoir le même pouvoir protéolytique vis-à-vis de la gélatine, sur des échantillons d'émulsion d'albumine coagulée. Cette méthode, employée par M. Effront, révèle des actions digestives très faibles : elle est même plus sensible que celle des tubes de Mette.

Après quelques heures de séjour à l'étuve à 40°, on voit les échantillons contenant la pepsine en présence d'acide libre devenus parfaitement limpides. Il faut un temps un peu plus long, mais cette dissolution a lieu aussi avec la pancréatine à la réaction neutre à la phénolphthaline.

Au contraire il n'y avait pas d'action du tout, même après un long temps, quelle que soit la réaction, dans aucun des échantillons, qui avaient reçu de la *protéase* ou de la *papaine*.

C'est là vraiment un caractère différentiel bien tranché entre les diastases digestives de l'organisme animal et les deux d'origine végétale que j'ai examinées. Ces dernières n'ont pas la faculté de dissoudre l'albumine coagulée.

J'ai pu m'assurer que cette différence n'est pas due à la

présence de substances inertes, ni à d'autres influences secondaires. Il restait seulement à rechercher si cela n'était pas une conséquence de la différente sensibilité de ces diastases à l'influence de la réaction du milieu.

En effet il est déjà bien démontré que l'action diastasique est fonction de la réaction.

Elle n'apparaît qu'entre des limites bien déterminées. Or, il est encore possible d'admettre que chaque substance, pour être digérée, doit se trouver dans des conditions spéciales de réaction.

S'il en est ainsi, une diastase peut agir sur une substance, à la seule condition que les limites entre lesquelles la diastase est active, correspondent à celles entre lesquelles la substance est attaquée.

Dans notre cas, on peut penser que la digestion de la gélatine, de la fibrine, des albuminates du sérum sanguin, et de la caséine peut se faire déjà au voisinage de la neutralité.

Au contraire, l'albumine d'œuf coagulée ne peut être dissoute que dans des milieux franchement acides ou alcalins.

Alors, la protéase et la papaïne, qui ont leur maximum d'activité à des réactions comprises entre l'acidité au tournesol et celle au méthylorange, peuvent bien digérer les albuminoïdes mentionnés d'abord, tandis que, en agissant sur l'albumine coagulée, ou bien la réaction est neutre et celle-ci n'est pas attaquable, ou la réaction est appropriée à la substance, et la diastase devient inactive.

Dans le cours de ces expériences, je croyais avoir eu des indications dans ce sens, et j'ai voulu établir une expérience pour démontrer l'exactitude de cette hypothèse. Il fallait, en somme, opérer avec une solution fortement active d'une de ces diastases, et voir si en poussant la réaction on ne pouvait pas obtenir la digestion de l'albumine.

EXPÉRIENCE. — Ayant déjà épuisé la provision de protéase, j'ai dû me contenter de comparer dans ce cas la pepsine avec la papaïne : celle-ci au point de vue de cette expérience pouvait bien remplacer la protéase.

Digestion de la gélatine. — Pour exprimer l'intensité de la digestion, nous avons indiqué la température à laquelle chaque mélange est solidifiable. Il a été nécessaire de modifier ainsi la méthode, puisqu'en employant des solutions très actives la liquéfaction se faisait trop rapidement. Naturellement

la digestion est plus intense dans les essais qui se solidifient à une température plus basse.

Le signe — indique que le mélange ne se solidifiait même pas à 0°. On a indiqué la réaction par le titre correspondant à la quantité d'acide qui est entré dans la composition des mélanges.

Par la pepsine		Neutre.	Acide N/20.	Acide N/10.	Acide N/2.	Acide N.
Le mélange avec 10 ^{cc} est solide à		18°	10°	0°	5°	5°
« « 8 «		18°	10°	0°	5°	5°
« « 6 «		18°	10°	5°	10°	15°
« « 4 «		18°	15°	5°	15°	15°
« « 2 «		18°	18°	10°	18°	18°

Par la papaïne :

Le mélange avec 10 ^{cc} est solide à	—	—	—	5°	5°
« « 8 «	—	—	—	5°	5°
« « 6 «	—	—	0°	10°	10°
« « 4 «	—	0°	—	15°	15°
« « 2 «	—	0°	5°	18°	18°

Digestion de l'albumine d'œuf en solution à 1 0/0. — La comparaison a été établie sur des parties égales des divers mélanges, additionnées d'un volume de solution saturée de chlorure de sodium et chauffée à 100° dans les mêmes conditions. Avec les chiffres ci-dessous on a indiqué la quantité d'albumine coagulable appréciée à l'œil.

L'albumine coagulable des mélanges avant la digestion, étant comme 10, elle est, après 12 heures, à l'étuve à 45° :

	Par la pepsine.	Par la papaïne.
1° Dans les mélanges à la réaction neutre	comme 10	comme 9
2° — — — — acide N/200	— 9	— 9
3° — — — — N/100	— 7	— 9
4° — — — — N/50	— 5	— 9
5° — — — — N/20	— 2	— 9
6° — — — — N/10	— 1	— 9
7° — — — — N/5	— 0	— 9
8° — — — — N/2	— 0	— 9
9° — — — — N	— 0	— 9

Digestion de l'albumine d'œuf coagulée. — Nous nous sommes servi dans ce cas avec avantage de la méthode de Mette.

Albumine digérée en millimètres.

1.	Par le mélange neutre de pepsine	0 ^{mm} ,	de papaïne	0 ^{mm}
2.	— acide N/200	— 0	—	0
3.	— N/100	— 1,0	—	0
4.	— N/50	— 3,5	—	0
5.	— N/20	— 5,0	—	0
6.	— N/10	— 7,5	—	0
7.	— N/5	— 8,0	—	0
8.	— N/2	— 9,5	—	0
9.	— N	— 12,0	—	0

La signification des résultats de cette dernière expérience est tout à fait évidente. Une solution de papaïne, très active sur

la gélatine, ne digère presque pas l'albumine d'œuf en solution, et n'attaque pas du tout l'albumine coagulée, quand, à côté d'elle, dans les mêmes conditions, une solution de pepsine, qui est bien plus faible vis-à-vis de la gélatine, digère l'albumine en solution et dissout l'albumine coagulée d'une façon intense.

On voit qu'il y a bien une différence dans la manière de se comporter des deux diastases vis-à-vis de la réaction, mais l'intervention de l'acidité ne peut pas expliquer tout le phénomène. En effet les solutions de papaïne sont encore très actives sur la gélatine à un degré d'acidité auquel la digestion de l'albumine doit bien être possible. Il faut en conclure que la papaïne et la protéase ne possèdent pas la faculté de décoaguler l'albumine. Cela explique pourquoi elles sont moins actives sur les albumines en général, et complètement inactives sur l'albumine d'œuf.

Il vient naturellement à l'esprit qu'à côté des diastases protéolytiques proprement dites, il existe une diastase décoagulante, qui est présente dans les préparations de pepsine et de pancréatine, et manque dans les deux autres.

J'ai songé dans cet ordre d'idées à rechercher si dans la pepsine on pouvait séparer ces deux actions. Cela ne m'a pas réussi par le chauffage à diverses températures. J'ai vu que c'est à 70° que les deux facultés sont uniformément atteintes. J'avais cru pouvoir les distinguer par l'influence de la réaction qui paraît différente. En effet la présence de doses croissantes d'acide libre gêne davantage l'action de la pepsine sur la gélatine, que celle sur l'albumine.

J'ai eu recours alors à la méthode employée à plusieurs reprises dans le cours de ces expériences, et qui consiste à étudier l'influence de la réaction non pas directement sur l'action de la diastase en présence de ces substances à digérer, mais sur la diminution de l'activité de la diastase seule en solution. J'ai vu ainsi que la réaction *optima* de conservation est sensiblement la même pour les deux facultés, et on ne peut tabler là-dessus pour attribuer à deux agents différents les deux actions en question.

*
* *

Dans les expériences que je viens d'exposer, l'étude compa-

rative des diastases protéolytiques n'est qu'à peine ébauchée.

Les résultats auxquels on est arrivé sont sûrs, car de nombreux essais les ont confirmés, mais ils ne sont encore ni précis ni complets. Il faut pousser les recherches jusqu'à établir la comparaison sur des individus chimiques bien définis, et il faut aussi la fixer avec des chiffres plus significatifs.

Au point de vue de la technique, je crois pouvoir affirmer que, bien que le pouvoir protéolytique évalué sur la gélatine ne s'applique pas aux autres substances albuminoïdes, ce moyen est précieux pour déterminer les variations dans l'activité de ces diastases, qui n'attaquent pas l'albumine coagulée.

En attendant, les résultats fournis par ces recherches nous ont appris que *la protéase de l'Aspergillus niger a les caractères d'une diastase protéolytique végétale* : elle ressemble de près à la papaïne et à la diastase protéolytique du malt. Elle agit sur la gélatine, sur les nucléo-albumines, sur les globulines et sur les albuminates. Sur l'albumine elle n'a pas d'action, sinon après que celle-ci a subi une première transformation : l'albumine d'œuf n'est jamais digérée, et cela probablement à cause de la facilité avec laquelle ses solutions donnent lieu à une coagulation, la protéase n'ayant pas la faculté de dissoudre l'albumine coagulée.

La place de la protéase parmi les autres diastases protéolytiques est à présent bien déterminée par les caractères qui résultent de l'influence de la réaction.

La réaction la plus favorable est la neutralité au méthylorange, c'est-à-dire l'acidité par des phosphates acides.

On ne peut pas la confondre avec la pepsine, qui agit en présence d'acide libre, et possède en plus le pouvoir dissolvant sur l'albumine coagulée. Elle ne diffère de la papaïne que par une plus grande sensibilité envers l'action nuisible des phosphates alcalins ; enfin elle est bien distincte de la pancréatine qui agit en présence de phosphates alcalins et qui n'attaque pas l'albumine coagulée.

*
* *

Il résulte de cette étude de la protéase de l'*Aspergillus niger* une notion générale.

Le caractère principal d'une diastase consiste dans sa manière de se comporter vis-à-vis de la réaction du milieu. La

physionomie de chacune d'elles est donnée par le degré de réaction le plus favorable à leur activité.

On a pu voir que cela est vrai pour la résistance de la diastase envers les influences destructrices, qu'il en est de même de son activité sur chaque albuminoïde, et qu'enfin c'est là le seul moyen sûr de les distinguer les unes des autres.

Les connaissances actuelles ne permettent pas de décider s'il existe des diastases spécifiques pour chaque substance albuminoïde, dont les préparations qu'on emploie seraient des mélanges. Seulement ces expériences ont montré que l'action de la même diastase vis-à-vis des différents albuminoïdes n'est pas proportionnelle, et qu'il existe deux actions distinctes, celle de décoagulation de l'albumine, et l'autre de protéolyse.

Je veux enfin attirer l'attention sur la parenté étroite qui existe entre la protéase et la papaïne. Cela peut avoir une signification biologique bien intéressante, si l'on considère que ces deux diastases exercent leur fonction à l'intérieur des cellules, et que leur rôle essentiel doit être dans la désassimilation. La pepsine et la pancréatine opèrent la digestion extracellulaire et elles ont des caractères nouveaux.

BIBLIOGRAPHIE

1. WROBLEWSKY, Ueber die chemische Beschaffenheit der Diastase und über das Vorkommen eines Arabans in den Diastase präparaten. — (*Berichte*, 1898, XXX, 2289.)
 2. G. C. VAN DER HEIDE, Gelatinöse Lösungen und Verflüssigungspunkte der Nahrgeatine. — (*Arch. f. Hygiene*, Bd. 31, p. 83.)
 3. F. HOFMEISTER, Ueber die chemische Struktur des Kollagens. (*Zeitschr. f. phys. Chemie*, Bd. 2, 1878, p. 299.)
 4. DASTRE ET FLORESCO, Liquéfaction de la gélatine. Digestion saline (*C. R. de la Société de Biologie*, 1895, 10^e série, n° 2, p. 671.)
 5. NLENCKI, Ueber die Zersetzung der Gelatine und des Eiweisses bei der Faulniss mit Pankreas. (*Berichte*, Bd. 8, 1895, p. 206.)
 6. KUHNE, *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, 1868, p. 356.
 7. CHITTENDEN ET SOLLEY, The primary cleavage products formed in the digestion of gelatin. (*The Journ. of Physiology*, XII, 1891, p. 23.)
 8. KLUG, Ueber die Verdaulichkeit des Leims. (*Pfluger's Archiv*. Bd. 48, 1891, p. 100.)
 - NEUMEISTER. *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, I, Th., 1893, p. 204.
 - NEUMEISTER. Ueber die Reactionen der Albumosen und Peptone. (*Zeitschrift f. Biologie*, N. F. Bd, p. 340.)
-